[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95194095.3

[51] Int. Cl[7]
C12N 15/12
C12N 15/62 C12N 15/67
C12N 1/19 C12N 1/21
C12N 5/10 A61K 38/16
A61K 39/395 A61K 48/00
C07K 14/435 C07K 14/715
C07K 16/18 C07K 16/28

[45] 授权公告日 2004 年 10 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 1173033C

[22] 申请日 1995.5.11 [21] 申请号 95194095.3

[30] 优先权

[32] 1994. 5.11 [33] IL [31] 109632

[32] 1994.10. 2 [33] IL [31] 111125

[86] 国际申请 PCT/US1995/005854 1995.5.11

[87] 国际公布 WO1995/031544 英 1995.11.23

[85] 进入国家阶段日期 1997.1.10

[71] 专利权人 耶达研究与发展有限公司

地址 以色列国雷霍沃特市

[72] 发明人 戴威·瓦拉赫 马克·保尔丁
艾戈尔·迈特
欧根·法尔伏洛梅耶夫

审查员 周 霞

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 严 舫 郑 霞

C07K 19/00 G01N 33/53
G01N 37/00 A61P 35/00

权利要求书 2 页 说明书 104 页 附图 16 页

[54] 发明名称 TNF/NGF 超家族受体和可溶性寡聚 TNF/NGF 超家族受体的调节剂

[57] 摘要

本发明总地来说是涉及一些新型蛋白质，它们能结合于 P55 和 P75 TNF－Rs 及 Fas－R 的胞内区，它们能调节 P55 和 P75 TNF－Rs 及 Fas－R 的功能及其编码的 DNA 序列的功能。本发明还涉及一些新型可溶性寡聚 TNF－Rs，寡聚 Fas－Rs 及具有 TNF－Rs 和 Fas－Rs 混合物的寡聚物受体。此外，本发明还涉及所有前述物质的制法和用途。

ISSN1008-4274

1．一种分离的 DNA 分子，编码一种能够结合于 p55 TNF 受体的胞内区的多肽，

该多肽是

（i）SEQ ID NO：25 的残基 206－426 的多肽，

（ii）SEQ ID NO：26 的残基 334－454 的多肽，或者

（iii）SEQ ID NO：14 的多肽。

2．一种载体，其中的外源 DNA 是权利要求 1 所述的 DNA 分子。

3．转化了的真核或原核缩主细胞，含有权利要求 2 所述的载体。

4．一种生产能够结合于 p55 TNF 受体的胞内区的多肽的方法，该方法包括：在适合表达产物从所述的细胞中表达的条件下培养权利要求 3 所述的转化了的宿主细胞，必要时，进行所述的表达产物的翻译后修饰以便得到所说的多肽，以及自所说的转化了的细胞的培养基中或自所说的转化了的细胞的细胞提取物中提取所说的多肽。

5．一种分离的 DNA 分子，其编码选自本文定义的蛋白质 55.1，即 SEQ ID NO：25 的残基 328－426，55.3，即 SEQ ID NO：25 的残基 277－426，和 55.1，即 SEQ ID NO：14 的蛋白质。

6．权利要求 5 所述的分离的 DNA 分子，其编码蛋白质 55.1，该蛋白质具有对应于 SEQ ID NO：25 的氨基酸残基 328－426 的氨基酸序列。

7．权利要求 5 所述的分离的 DNA 分子，其编码蛋白质 55.3，该蛋白质具有对应于 SEQ ID NO：25 的氨基酸残基 277－残基 426 的氨基酸序列。

8．权利要求 5 所述的分离的 DNA 分子，其编码蛋白质 55.11，该蛋白质具有 SEQ ID NO：14 的氨基酸序列。

9．一种载体，其中的外源 DNA 是权利要求 5 所述的 DNA 分子。

10．转化了的真核或原核缩主细胞，含有权利要求 9 所述的载体。

11．一种生产能够结合于 p55 TNF 受体的胞内区的多肽的方法，该方法包括：在适合表达产物从所述的细胞中表达的条件下培养权利要求 10 所述的转化了的宿主细胞，必要时，进行所述的表达产物的翻译后修饰以

便得到所说的多肽，以及自所说的转化了的细胞的培养基中或自所说的转化了的细胞的细胞提取物中提取所说的多肽。

12．权利要求 1 所述的分离的 DNA 分子，是 SEQ ID NO：9 的序列。

13．一种多肽，由权利要求 1，5－7，和 12 中任何一项所述的 DNA 分子编码，所述的多肽能够结合于 p55 TNF 受体的胞内区。

14．抗体，对于权利要求 13 所述的多肽具有特异性。

15．用权利要求 14 所述的抗体制备用于处理细胞的药物的用途，所说的处理是将所述的药物应用于所说的细胞，其中当所说的细胞的 IC－结合蛋白质曝露于胞外表面时，则所述的药物便配制作为胞外应用，而当所说的 IC－结合蛋白质为胞内的时，则所述的药物便配制作为胞内应用。

16．一种或者多种根据权利要求 13 所述的多肽制备用于处理细胞的药物的用途，所述的多肽能够结合于 TNF－R 的胞内区和调节 TNF－R 的活性，其中所说的细胞处理是通过将所述的药物以适用于其胞内引入的形式引入所说的细胞中。

17．使用权利要求 1 所述的分离的 DNA 分子以载有该序列的适合载体形式制备成用于处理细胞的药物的用途，其中所说的细胞处理是通过将所说的药物以所说的序列在所说的细胞中表达的方式导入所说的细胞中。

18．一种或者多种根据权利要求 13 所述的多肽用于制备用于诱导细胞或组织中 TNF－相关的效应的药物的用途，其中所说的诱导是通过将所说的药物以适合于其胞内引入的形式引入所说的细胞中。

19．使用权利要求 1 所述的分离的 DNA 分子以载有该序列的适合载体形式制备成用于诱导细胞或组织中 TNF－相关的效应的药物的用途，其中所说的诱导是通过将所说的药物以使所说的序列在所述的细胞中表达的方式导入所说的细胞中。

20．一种用于调节 TNF－R 配体对细胞效应的药用组合物，包含权利要求 13 所述的一种多肽作为活性成分。

21．一种用于调节 TNF－R 配体对细胞效应的药用组合物，包含编码权利要求 13 所述的一种多肽的重组动物病毒载体作为活性成分。

TNF/NGF超家族受体和可溶性寡聚TNF/NGF超家族受体的调节剂

发明领域

本发明总体说来涉及TNF/NGF受体超家族中的一些受体，及其生物功能的调节。TNF/NGF受体超家族包括这样一些受体，例如P55和P75肿瘤坏死因子受体（TNF-Rs）和FAS配基受体（也叫做FAS/APOI或FAS-R，以下叫做FAS-R）等。更具体地讲，本发明涉及一些新型蛋白质，它们能结合于P55和P75TNF-Rs以及Fas-R的胞内区（IC）（这些胞内区分别叫做P55IC，P75IC及Fas-IC），这些新型蛋白质能够调节P55和P75TNF-Rs及Fas-R的功能。其中能够结合整体P55-TNF-R的P55IC的一种蛋白质是P55IC本身或该分子的一部分，例如叫做P55IC的“死亡功能域”（death domain，缩写为DD）。因而，本发明还涉及一种新型TNF相关效应，该效应能够由P55TNF-R或其片段的胞内区（P55IC）在细胞内以不依赖于配基（TNF）的方式诱导产生。本发明还涉及这些新型蛋白质的制备及用途，包括P55和P75TNF-R结合蛋白质，和FAS-R结合蛋白质，此处叫做P55IC结合蛋白质、P75IC结合蛋白质及FAS-IC结合蛋白质。

另一方面，本发明还涉及新型可溶性寡聚（oligomeric）TNF-Rs、寡聚FAS-Rs以及含TNF-Rs和FAS-Rs混合物的寡聚受体，它们的用途及生产方法。

发明背景和先有技术

肿瘤坏死因子（TNF-α）和淋巴毒素（TNF-β）（以下提到的TNF是指TNF-α 和TNF-β）主要是由单核巨噬细胞所形成的多功能发炎细胞激动素原（pro-inflammatory cytokine），它对细胞有多种

作用（Wallach, D.(1986)）：Interferon 7（Ion Gresser编），PP83-122, Academic press,London;and Beutler and Cerami(1987)）。ＴＮＦ－α和ＴＮＦ－β通过结合于特定细胞表面受体而发挥它们的作用。它们的某些作用也许对生物体是有益的：例如它们可以消灭肿瘤细胞和病毒感染的细胞，以及增加粒细胞的抗菌活性。这样，ＴＮＦ便能对抵抗肿瘤和感染剂的生物体防卫体系有作用，同时对损伤的恢复也有作用。因此，ＴＮＦ可用作抗肿瘤剂，在此应用中ＴＮＦ是结合于肿瘤细胞表面上的受体并以此而引发肿瘤细胞表面上的受体并以此而引致肿瘤细胞的死亡。ＴＮＦ还可以用作抗感染剂。

然而，ＴＮＦ－α和ＴＮＦ－β还有有害的作用。已经证明，过多的合成ＴＮＦ－α对几种疾病会起到主要致病作用。ＴＮＦ－α对血管系统的作用，现在已知是引起败血休克症的主要原因（Tracey等，1996）。在某些疾病中，ＴＮＦ会通过抑制脂细胞活性和引起厌食症而造成过度的体重减轻（恶病质），因而ＴＮＦ－α被叫做恶病质素。ＴＮＦ还被描述为风湿症中组织坏死调节因子（Beutler and Cerami,1987），以及在移植体对抗宿主反应中所出现的不良反应的主要调节因子（Piquet等,1987）。此外，已知ＴＮＦ与发炎和许多其它疾病有关。

两种不种不同的、独立表述的受体，Ｐ５５ＴＮＦ－Ｒｓ和Ｐ７５ＴＮＦ－Ｒｓ，能专一地结合ＴＮＦ－α和ＴＮＦ－β，而引发和/或介导上述ＴＮＦ的生物效应。这两种受体具有结构上不同的胞内区，因此信号作用方式也不同，（参见Hohmann等，1989; Engelmann等，1990; Brockhaus等，1990; Leotscher等,1990; Schall等,1990; Nophar等,1990; Smith等,1990; 以及Heller等,1990）。但是其细胞学机理，例如涉及Ｐ５５和Ｐ７５ＴＮＦ－Ｒｓ的胞内信号作用的各种相关蛋白质及可能的其它因子，尚待阐明（下面提出的是首次描述，这种能够结合于Ｐ７５ＩＣ和Ｐ５５ＩＣ的新型蛋白质是这种胞内信号作用，通常是发生于配基即ＴＮＦ（α或β）结合于受体之后，引发的级联放大反应，并最终导致细胞对ＴＮＦ的反应。

关于上述ＴＮＦ的杀细胞效应（cytocidal effect），在迄今所研究过的大多数细胞中，这种效应主要是应由Ｐ５５ＴＮＦ－Ｒ所触发。抗

Ｐ５５ＴＮＦ－Ｒ的胞外区（配基结合区）的抗体，其本身能够触发杀细胞效应（参见ＥＰ４１２４８６），因而杀细胞效应是与抗体与受体结合的有效性相联系，并被认为是产生胞内信号作用过程的第一步。此外，突变研究（Brakebusch等，1992；Tartaglia等，1993）表明，Ｐ５５ＴＮＦ－Ｒ的生物功能决定于它的胞内区的完整性，因此有人提出由于胞内信号的起动而导致ＴＮＦ的杀细胞效应是Ｐ５５ＴＮＦ－Ｒ的两个或更多胞内区发生缔合作用的结果。而且，ＴＮＦ（α或β）的出现是作为一种同源三聚体（homotrimer），并正如所提议的，通过Ｐ５５ＴＮＦ－Ｒ结合于受体分子并与之交联亦即引起受体的聚集作用(aggregation)而诱导胞内信号发生。下面述及Ｐ５５ＩＣ和Ｐ５５ＤＤ是如何自缔合并以不依赖于配基的方式诱导细胞内与ＴＮＦ有关的效应。

ＴＮＦ/ＮＧＦ受体超家族的另一成员是ＦＡＳ受体（ＦＡＳ－Ｒ），它还被叫做Ｆas抗原，即一种在各种组织中皆可表达的细胞表面蛋白，并与许多细胞表面受体，包括ＴＮＦ－Ｒ和ＮＧＦ－Ｒ，具同源性。ＦＡＳ－Ｒ以偏程性细胞死亡（apoptosis）形式介导细胞死亡（Itoh等，1991），并表现为自身反应Ｔ细胞的负性选择者(negative selector)亦即在Ｔ细胞成熟过程中ＦＡＳ－Ｒ介导能识别自身抗原的Ｔ细胞的编程性死亡。还发现，ＦＡＳ－Ｒ基因(IPr)的突变能引起小鼠淋巴细胞增生病症，该病症类似于人自体免疫病系统性红斑狼疮（ＳＬＥ）（Watanabe-Fukunage等,1992）。ＦＡＳ－Ｒ的配基似乎是一种细胞表面结合分子，它由杀伤Ｔ细胞（或细胞毒性Ｔ淋巴细胞－ＣＴＬｓ）携载，因而当这样的ＣＴＬｓ接触携载着ＦＡＳ－Ｒ的细胞时，它们能够诱发携载ＦＡＳ－Ｒ的细胞发生编程性死亡。进一步，已经制备了一种单克隆抗体，它对ＦＡＳ－Ｒ具有特异性，此单克隆抗体能够诱发携载ＦＡＳ－Ｒ的细胞发生编程性死亡，包括由编码人ＦＡＳ－Ｒ的ｃＤＮＡ转化的小鼠细胞的编程性细胞死亡（Itoh等,1991）。

还发现，除Ｔ淋巴细胞之外，各种其它正常细胞均能在自己的表面上表达ＦＡＳ－Ｒ，并能通过该受体的触发而被杀灭。这种杀灭过程的无节制的诱导可能在某些疾病中对组织损伤起了作用，例如急性肝炎的肝细胞

破坏作用。因而寻找途径来抑制ＦＡＳ－Ｒ的细胞毒素活性有很大医疗潜力。

相反地，由于还发现某些恶性细胞和ＨＩＶ感染细胞在它们的表面上携载有ＦＡＳ－Ｒ，所以在这些细胞中抗ＦＡＳ－Ｒ或ＦＡＳ－Ｒ配基的抗体可用来触发ＦＡＳ－Ｒ介导的细胞毒性作用，并以此提供一种方法来抵抗这种恶性细胞或ＨＩＶ感染细胞（参见Itoh等,1991）。寻找其它方法以增强ＦＡＳ－Ｒ的细胞毒性活性，也会有医疗潜力。

长期以来人们感觉到需提供一种途径来调节细胞对ＴＮＦ（α或β）和ＦＡＳ－Ｒ配基的应答，例如在上述病理情况下，ＴＮＦ或ＦＡＳ－Ｒ配基是超量表达的，因而需抑制ＴＮＦ或ＦＡＳ－Ｒ配基诱发的杀细胞作用；而在另一些情况下，例如创伤愈合过程中，需增强ＴＮＦ效应，或者在肿瘤细胞或ＨＩＶ感染细胞中，需增强ＦＡＳ－Ｒ的介导作用。

本发明人已提出了一些方法（例如可参见欧洲申请号：EP186833,EP308378,EP398327及EP412486）来调节ＴＮＦ的有害作用。例如通过用抗ＴＮＦ的抗体来抑制ＴＮＦ结合于它的受体，或者通过使用可溶性ＴＮＦ受体（基本上是受体的可溶性胞外区）竞争性抑制ＴＮＦ与细胞表面结合的ＴＮＦ－Ｒs的结合。进一步，根据ＴＮＦ必须结合于它的受体才能诱发细胞效应，本发明人已经提出了一些途径来调节ＴＮＦ效应，即通过调节ＴＮＦ－Ｒs的活性。简言之，EP0 568925是关于一种调节ＴＮＦ－Ｒs的信号转导（signal transduction）和/或剪切的方法，通过此法肽或其它分子会与受体本身或与效应因子(effector)（该蛋白质能与受体相互作用）相互作用来调节ＴＮＦ－Ｒs的正常功能。在EP0 568925中描述了各种Ｐ５５ＴＮＦ－Ｒs突变体（mutant)的构建和鉴定，这些突变发生在Ｐ５５ＴＮＦ－Ｒ的胞外区、跨膜(transmembranal)区，及胞内区。用此方法，上述Ｐ５５ＴＮＦ－Ｒ区内的一些区段（regions)已经证实对受体的功能是必需的，亦即对配基（ＴＮＦ）的结合和随后的信号转导以及最终导致ＴＮＦ效应的胞内信号应答都是必要的。进一步，还描述了许多分离和鉴定能够结合于上述ＴＮＦ－Ｒ功能域内各区段的蛋白质、肽类或其它遗传因子的途径，这些蛋白质、肽类和其它因子都与调节

ＴＮＦ－Ｒ的活性有关。在EP0568925中也提出了另外许多方法，包括如何分离和克隆编码这些蛋白质和肽类基因；如何构建用于产生这些蛋白的表达载体；如何制备这些蛋白的抗体或能与ＴＮＦ－Ｒ作用的肽类片段，也有方法来制备能与ＴＮＦ－Ｒ不同区域结合的肽类片段。然而，在EP0568925中既未述及能够结合于TNF-Ｒs的胞内区的实际蛋白质和肽类（例如Ｐ５５ＴＮＦ－Ｒ），又未述及如何利用酵母双杂种法(yeast two-hybrid)来分离和鉴定这些能结合于ＴＮＦ－Ｒs的胞内区的蛋白质或肽类。同样，迄今为止，对能够结合ＦＡＳ－Ｒ胞内区的蛋白质或肽类未见报道。

因此，当需要抑制ＴＮＦ或ＦＡＳ－Ｒ配基的作用时，就需减少细胞表面上的ＴＮＦ－Ｒs或ＦＡＳ－Ｒ的数量或活性；而当需要增强ＴＮＦ或者ＦＡＳ－Ｒ配基的作用时，就需增加ＴＮＦ－Ｒs或ＦＡＳ－Ｒ的数量或活性。为达到此目的，本发明人最近对Ｐ５５ＴＮＦ－Ｒ和Ｐ７５ＴＮＦ－Ｒ的启动子（promoters）进行测序分析，发现了多种主要的关键性序列元件（sequence motifs），它们对各种转录调节因子具特异性，还发现这些ＴＮＦ－Ｒs的表达在启动子水平上受调控，亦即抑制启动子的转录以减少受体的数量和增强启动子转录增加受体数量（参见ＩＬ104355和IL109633以及它们相应的有关未发表的ＥＰ和ＰＣＴ的对应部分)。关于在ＦＡＳ－Ｒ基因启动子水平上的调控相应研究，尚待报道。

进一步，还应提到，一方面已知肿瘤坏死因子（ＴＮＦ）受体，和结构上有关的ＦＡＳ－Ｒ受体，当受到白细胞产生的配基的刺激时，会触发细胞内的裂解活性而导致其自身死亡，然而对这种触发机理还知道得很少。突变研究指出，在ＦＡＳ－Ｒ和Ｐ５５ＴＮＦ受体（Ｐ５５－Ｒ）中，细胞毒性信号的表达涉及其胞内区的不同区段（Brakebusch等，1992; Tartaglia等，１９９３; Itoh and Nagata,1993）。这些区段，即所谓“死亡功能域”(death domain）具有序列的同源性。ＦＡＳ－Ｒ和Ｐ５５－Ｒ的“死亡功能域”趋于自身缔合。它们的自身缔合作用（self-association），明显地促进了受体的聚集作用(aggregation），而聚集作用是引发信号作用所需要的（如下所述，并参见Song等,1994 ;wallach

等,1994; Boldin等, 1995), 受体大量表达将触发与配基无关的信号作用产生(如下所述, 和Boldin等,1995)。

因此, 在本发明之前, 未曾有人提供这样的蛋白质, 即能调节属于TNF/NGF超家族的配基的作用的蛋白质, 例如TNF或FAS-R配基对细胞的作用是通过介异胞内信号作用过程进行的, 此信号作用颇大程度上可能是由属于TNF/NGF受体超家族的一些受体的胞内区(ICs)所支配, 例如TNF-Rs的胞内区, 亦即P55和p75TNF-R胞内区(分别为P55IC和P75IC)以及FAS-IC。

因而, 本发明的目的之一是提供一些蛋白质, 它们能够结合于TNF-Rs和FAS-R的胞内区, 这些蛋白质现在被认为与胞内信号发生过程有关, 而信号发生是由于TNF结合于它的受体所引起, 或FAS配基结合于它的受体所引起。

本发明的另一目的是提供一些拮抗剂(antagonists)(例如抗体), 来对抗这些胞内区结合蛋白质(IC-结合蛋白质), 这些拮抗剂可用来抑制信号发生过程, 即当这种IC-结合蛋白质是正效应因子(effectors)(亦即诱导信号发生)时; 或用来增强信号发生过程, 即当这些蛋白质是负效应因子(亦即抑制信号发生)。

本发明还有另一目的是利用这些IC-结合蛋白质来分离和鉴定其他相关的蛋白质或者效应因子。这些蛋白和效应因子参予信号传导的下游事件及上游事件而IC-结合蛋白(如其它TNF-Rs或相关受体)也必参予这些事件。

本发明另外一个目的是利用上述IC-结合蛋白作为抗原制备相应的多克隆和/或单克隆抗体。这些抗体也可依次用于纯化新的不同来源的IC-结合蛋白, 例如来自细胞提取物或转化的细胞系的IC-结合蛋白。

而且, 这些抗体可用于诊断目的, 例如用于鉴定与细胞效应的功能失常有关的疾病, 所说的细胞效应由属于TNF/NGF受体超家族的一些受体介导。

本发明的进一步目的是提供一些含有上述IC-结合蛋白质的药物组合物, 和一些含有IC-结合蛋白质拮抗剂的药物组合物, 用于治疗或预

防ＴＮＦ诱发的或ＦＡＳ配基－诱发的病症，例如根据药物中所含ＩＣ－结合蛋白或其拮抗剂的性质，这些药物可用来增强ＴＮＦ效应或ＦＡＳ配基效应,或者来抑制TNF效应或FAS配基效应。

而且，根据本发明的另一目的，本发明公开了另外一些方法，通过使用可溶性寡聚ＴＮＦ－Ｒs、寡聚ＦＡＳ－Ｒs、或者ＴＮＦ－Ｒs和ＦＡＳ－Ｒs混合物的寡聚物来消除或拮抗内生的或外部施用的ＴＮＦ或ＦＡＳ－Ｒ配基。在这方面应当提到，曾经有人试图分离和重组生产ＴＮＦ结合蛋白质，该蛋白质叫做ＴＢＰ－１，它显示出能够拮抗ＴＮＦ的作用。这种拮抗现象的测定，是通过测量ＴＮＦ的细胞活性降低情况，以及通过测量干扰ＴＮＦ结合于它的受体的情况（ＥＰ308378)来实现的。ＴＢＰ－１已被证明在浓度为数ng/ml时并同时应用这些细胞激动素能够保护细胞不受ＴＮＦ的毒性影响并且能干扰ＴＮＦ－α和ＴＮＦ－β结合于细胞。进一步关于ＴＢＰ－１作用机理的研究表明ＴＢＰ－１不与靶细胞相互作用，而是通过专一结合ＴＮＦ，从而与ＴＮＦ受体竞争ＴＮＦ来封闭ＴＮＦ的功能，因而，用不同的纯化技术，发现存在两种活性组分：一种是ＴＢＰ－１，第二种是ＴＮＦ－结合蛋白，我们将后者叫做ＴＢＰ－Ⅱ（最早在ＥＰ３９８３２７中作过描述）。这两种蛋白质可起保护作用，用以对抗ＴＮＦ的体外杀细胞作用，它们结合ＴＮＦ－β有效性低于结合ＴＮＦ－α的有效性。虽然通过ＳＤＳ凝胶电泳分析这两种蛋白质（ＴＢＰ－Ⅰ和ＴＢＰ－Ⅱ），似乎具有很相近的分子量，但根据其彼此缺乏免疫交叉反应性(cross reactivity)它们还能清楚地被加以区别，另外，其Ｎ－末端氨基酸列和氨基酸组成均有差异。

然而，上述早期的可溶ＴＮＦ结合蛋白是单体，并且只能结合同源三聚体中的一个单体，即一个天然配基，这样由于ＴＮＦ－仍然具有两个活性单体未被ＴＮＦ结合蛋白结合，ＴＮＦ仍具活性（亦即不完全中和）。而且，迄今为止尚没有关于可溶性ＦＡＳ－Ｒs（可溶性ＦＡＳ－Ｒ配基结合蛋白质）的报道，所说的可溶性ＦＡＳ－Ｒs能够结合于ＦＡＳ－Ｒ配基，ＦＡＳ－Ｒ已知是一种同源三聚体，也是一种细胞表面缔合分子。

一种所谓的Ｐ５５－ＩＣ的“死亡功能域”（Tartaglia等，1993)已

经被发现，但是并未说明。正如本发明所述的这样，Ｐ５５－ＩＣ和它的“死亡功能域”能够产生自缔合使用，这种自缔合作用是信号产生并导致诱发细胞毒性的主要原因。而且，这份报道并未谈到有可能合成可溶性寡聚ＴＦＮ－Ｒs，或可溶性寡聚ＦＡＳ－Ｒs，或它们的混合寡聚物，也未被露其它ＴＮＦ相关效应，即由本发明提到的Ｐ５５－ＩＣ或其所诱导的效应，例如ＩＬ－８－基因表达诱导的效应。同样，另一份报道，发表于本发明日之后，报道了Ｐ５５－ＩＣ的聚集作用（亦即自缔合作用），但并未谈及，如本发明所述的，利用Ｐ５５－ＩＣ自缔合作用制备可溶性寡聚ＴＮＦ－Ｒs或ＦＡＳ－Ｒs，也未谈及如本发明所述的由Ｐ５５－ＩＣ或其部分以不依赖于配基方式所诱发的其它ＴＮＦ－相关效应。

发明概述

正如本发明所述，我们已经发现了一些新型蛋白质，它们或能结合于Ｐ５５ＴＮＦ－Ｒ的胞内区（Ｐ５５ＩＣ－结合蛋白质）、Ｐ７５ＴＮＦ－Ｒ的胞内区（Ｐ７５ＩＣ－结合蛋白质），或能结合于ＦＡＳ－Ｒ的胞内区（ＦＡＳ－ＩＣ－结合蛋白质）。这些Ｐ５５ＩＣ－、Ｐ７５ＩＣ－以及ＦＡＳ－ＩＣ－结合蛋白，可用作ＴＮＦ或ＦＡＳ－Ｒ对细胞产生配位效应的介导因子(mediators)或调节剂(modulators)，作用方式是介导或调节胞内信号发生过程，此过程通常是在ＴＮＦ结合于Ｐ５５和/或Ｐ７５ＴＮＦ－Ｒ，或ＦＡＳ－Ｒ配基结合于细胞表面之后而发生。而且令人惊奇地是，Ｐ５５ＩＣ和ＦＡＳ－ＩＣ能够产生自缔合作用，并且Ｐ５５ＩＣ和ＦＡＳ－ＩＣ的一些片段同样能够结合于Ｐ５５ＩＣ，特别是结合于这些受体ＩＣ$_S$ 内的所谓“死亡功能域”（ＤＤ），亦即Ｐ５５ＤＤ和 ＦＡＳ－ＤＤ。因此Ｐ５５ＩＣ和ＰＡＳ－ＩＣ及其片段，还代表这样一些蛋白质，即它们能够结合于Ｐ５５ＩＣ和ＦＡＳ－ＩＣ，因而能够作为ＴＮＦ或ＦＡＳ－Ｒ对细胞产生配基作用的调节剂。

进一步充分阐明了本发明述及的新型蛋白质之一，此处定名为55.11蛋白质，结合于Ｐ５５－ＴＮＦ－Ｒ胞内区的本质（见实施例１）。

而且，另一方面，本发明是基于这样的发现：Ｐ５５ＴＮＦ受体的胞内区（Ｐ５５－ＩＣ），为一种区域，其中包含有所谓的Ｐ５５－ＩＣ“死亡功能域”；ＦＡＳ/ＡＰ０１受体的胞内区（Ｆａｓ－ＩＣ），为一区

域，其中包含有所谓的Fas－ＩＣ“死亡功能域”，这些胞内区能够产生自缔合作用。因而按照常规重组ＤＮＡ技术有可能制成一种可溶性寡聚ＴＮＦ受体，即一种融合蛋白，其一端含有ＴＮＦ受体的至少两个胞外区，另一端含有至少两个上述自缔合胞内区，或某一片段，这些区域能够发生自缔合作用而提供一种寡聚物，该寡聚物具有至少两个连接在一起的这种融合产物。这样的可溶性寡聚ＴＮＦ－Ｒ，是能够结合自然产生的ＴＮＦ同源三聚体中的两个单体，从而有效地中和ＴＮＦ的活性。ＴＮＦ活性的中和，在所有上述条件下都是必需的，即当其中ＴＮＦ在体内过量地产生，或是体外以高剂量施用，而产生不希望的副作用时。进一步，利用本发明的可溶性寡聚受体来有效地结合ＴＮＦ，还可用于结合外源ＴＮＦ，然后按所需量随后缓慢释放，例如其在治疗肿瘤方面的应用。同样，按照常规重组ＤＮＡ技术，还有可能构建一种寡聚ＦＡＳ－Ｒ融合产物，其一端含有至少两个ＦＡＳ－Ｒ的胞外区，而在另一端含有至少两个上述自缔合胞内区或其片段，这些区域自缔合会产生一种至少有两个融合产物连在一起的寡聚物。这种ＦＡＳ－Ｒ寡聚物，能够结合自然产生的ＦＡＳ－Ｒ配基同源三聚体中的两个单体，从而有效地中和ＦＡＳ－Ｒ配基的活性。ＦＡＳ－Ｒ配基活性的中和，在所有上述条件下都是必要的，因为在这些情况下过量的ＦＡＳ－Ｒ配基都与不理想的副作用有关。同样，鉴于最近报道指出ＴＮＦ与ＦＡＳ－Ｒ配基诱导的对细胞效应之间的可能联系，因而它们在结合受体的细胞表面也可能有联系。这样也就可能利用常规重组DNA技术构建一种复合寡聚物受体，同时具有对ＴＮＦ和ＦＡＳ－Ｒ配基二者的特异性。这种复合寡聚物是一种上述融合产物的混合物，一端含有至少一个ＴＮＦ－Ｒ的胞外区及至少一个ＦＡＳ－Ｒ的胞外区，另一端含有至少两个上述ＴＮＦ－Ｒ和ＦＡＳ－Ｒ的自－缔合的胞内区或其片段，这些区域能自－缔合而产生一种至少有两种融合产物连接在一起的混合寡聚物。这样的混合寡聚物能够结合ＴＮＦ的至少一个单体，同时结合ＦＡＳ－Ｒ配基的一个单体，这种复合寡聚物在下面条件下也能有效降低或中和细胞表面的ＴＮＦ和ＦＡＳ－Ｒ受体，即如上所述的过量的两种激素与不理想的细胞效应有关的情况。正如上面所指出，ＦＡＳ－Ｒ配基通

常是与细胞表面相缔合的，最近几份报告描述了细胞表面－缔合形式的ＴＮＦ。因此这些混合ＴＮＦ－Ｒ/ＦＡＳ－Ｒ寡聚物用于中和细胞表面上的ＴＮＦ和ＦＡＳ－Ｒ配基的活性是特别有效的。

为适应这些情况，本发明提供了编码一种蛋白的ＤＮＡ序列，该蛋白能够结合于一个或更多受体的一个或更多的胞内区，这些受体属于肿瘤坏死因子/神经生长因子（ＴＮＦ/ＮＧＦ）受体超家族。

特别的是，本发明提供了一种ＤＮＡ序列，是选自如下组成的一大类ＤＮＡ族:

（ａ）一种衍生自天然ＴＮＦ－Ｒ胞内区结合蛋白的编码区段的ｃＤＮＡ序列;

（ｂ）能够在不很严格的条件下杂交于（ａ）中的某段ＤＮＡ，并编码具有生物活性的ＴＮＦ－Ｒ胞内区－结合蛋白的ＤＮＡ序列；以及

（ｃ）因遗传密码简并性，简并为（ａ）、（ｂ）中的ＤＮＡ序列，它们编码具生物活性的ＴＮＦ－Ｒ胞内区－结合蛋白。

本发明还提供了一种ＤＮＡ序列，是选自如下组成的一大类ＤＮＡ族:

（ａ）一种ｃＤＮＡ序列，是衍生自天然ＦＡＳ－Ｒ胞内区－结合蛋白的编码区段;

（ｂ）一些ＤＮＡ序列，能够在温和条件下杂交于（ａ）的ｃＤＮＡ，并编码一种具生物活性的ＦＡＳ－Ｒ胞内区结合蛋白；以及

（ｃ）一些ＤＮＡ序列，由于遗传密码的简并值的结果简并为（ａ）和（ｂ）中所定义的ＤＮＡ序列，它们编码具生物活性ＦＡＳ－Ｒ胞内区－结合蛋白。

在本发明中，还包括一些编码Ｐ５５ＴＮＦ－Ｒ、Ｐ７５ＴＮＦ－Ｒ及ＦＡＳ－Ｒ胞内区结合蛋白的ＤＮＡ序列，例如命名为蛋白质５５．１，５５．３，５５．１１，７５．３，７５．１６，Ｆ２，Ｆ９及ＤＤ１１的ＤＮＡ序列。

本发明还提供了一种按照本发明上述任何一个序列来编码的蛋白质，或类似物，或其衍生物，所说的这些蛋白质、类似物及其衍生物是能够结

合于一个或一个以上ＴＮＦ－Ｒs或ＦＡＳ－Ｒ的一个或一个以上的胞内区。本发明这方面的实施例包括蛋白质５５．１，５５．３，５５．１１，７５．３，７５．１６，Ｆ２，Ｆ９及ＤＤ１１，及其类似物和衍生物。

本发明还提供了编码为本发明的上述蛋白质的一些载体（vectors），它们含有本发明的上述ＤＮＡ序列，并能够表达于适当的真核宿主细胞中或原核宿主细胞中，还提供了一种含有这种载体的转化了的真核或原核宿主细胞；以及生产本发明的蛋白质、类似物或者衍生物的方法，即在适合的表达条件下培养这些转化了的宿主细胞，对所说蛋白进行转译后加工，从转化了的细胞培养基或细胞提取物中提取细胞表达产物。

另一方面，本发明还提供了一些针对于本发明的蛋白质及其类似物和衍生物的抗体或其活性衍生物或其片段。

本发明另一方面，是提供了上述ＤＮＡ序列或蛋白质的各种用途，其使用包括:

（ｉ）一种方法用于调节ＴＮＦ或ＦＡＳ－Ｒ配基对载有ＴＮＦ－Ｒ或ＦＡＳ－Ｒ的细胞的作用。包括用一个或更多的蛋白质、类似物或衍生物处理细胞，这些蛋白、类似物或衍生物选自Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ或ＦＡＳ－ＤＤ蛋白以及它们的类似物或衍生物，所有上述蛋白质都能结合于胞内区并调节所述ＴＮＦ－Ｒ或ＦＡＳ－Ｒ的活性，其中所说的细胞处理包括将一种或多种蛋白质、类似物或衍生物以适合的胞内引入形式引入细胞，或者将编码该种蛋白质、类似物或衍生物的ＤＮＡ序列以适合的表达载体形式引入所说的细胞中;

（ii）一种方法用于调节ＴＮＦ或ＦＡＳ－Ｒ配基对载有ＴＮＦ－Ｒ或ＦＡＳ－Ｒ的细胞的作用，根据本发明，包括用抗体及其活性衍生物或片段来处理所说的细胞;

（iii）一种方法用于调节ＴＮＦ或ＦＡＳ－Ｒ配基对载有ＴＮＦ－Ｒ或ＦＡＳ－Ｒ的细胞的作用，包括用寡核苷酸序列处理所说的细胞，按照本发明寡核苷酸序列中至少部分序列编码该序列的反义序列（antisense sequence），或为编码Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ、或ＦＡＳ－ＤＤ序列的反义序列，所说的寡核苷酸序列能够封闭至少一种

TNF－R或FAS－R胞内区结合蛋白质的表达;

(iv)一种方法用于调节TNF或FAS－R配基对载有TNF－R或FAS－R的细胞的作用，包括:

（a）构建一种重组动物病毒载体，载有一编码病毒外壳蛋白的DNA序列，该蛋白能结合于某一特定细胞表面受体；并载有另一序列，是选自一寡核苷酸序列，该寡核苷酸序列其中至少部分序列为本发明中蛋白编码序列的反义序列，以及选自一编码P55IC、P55DD、FAS－IC或FAS－DD的序列的反义寡核苷酸序列，所说的寡核苷酸序列当通过病毒介导进入细胞后能够封闭至少一种TNF－R或FAS－R胞内区结合蛋白的表达；以及

（b）用（a）中所说的载体感染所说的细胞

（v）一种方法用于调节TNF或FAS－R配基对载有TNF－R或FAS－R的细胞的作用，包括用合适的编码一核酶的载体处理所说的细胞，该核酶有一序列，它对编码本发明中所述的蛋白、类似物或衍生物的mRNA序列有特异性；它对编码P55IC、P55DD、FAS－IC或FAS－DD的mRNA序列也有特异性。所说的核酶序列能够与所说的mRNA序列相互作用并能切割所说的mRNA序列，结果抑制了本发明中所述及的蛋白质，类似物或衍生物的表达，或抑制了P55IC、P55DD、FAS－IC或FAS－DD的表达;

（vi）一种方法用于处理肿瘤细胞或HIV感染细胞，或其他有病细胞，包括:

（a）构建重组动物病毒载体，它载有编码病毒外壳蛋白的DNA序列，该蛋白能够结合肿瘤细胞表面受体或HIV－感染的细胞表面受体，或者能够结合另外一些有病细胞的细胞表面受体；还载有本发明所提到的蛋白、类似物或衍生物的编码片段以及载有编码P55IC、P55DD、FAS－IC，FAS－DD，或其类似物或衍生物的序列。本发明所说的蛋白质、其类似物或衍生物，及P55IC、P55DD、FAS－IC、FAS－DD，类似物或衍生物，当表达于所说的肿瘤细胞或HIV－感染细胞或其它有病细胞之中时，均能杀灭这些细胞；以及

（ｂ）用（ａ）中所说的载体感染所说的肿瘤细胞或ＨＩＶ－感染细胞或其它被感染的细胞。

（vii）一种用于分离和鉴定蛋白、因子或受体的方法，按照本发明这些蛋白质、因子和受体能够结合于胞内区结合蛋白。分离和鉴定方法包括应用亲合色谱法，该法中所说蛋白能附着于亲合层析中的基质上，这些附着的蛋白又与细胞提取物中的某些蛋白质、因子或受体相互接合，然后结合蛋白再被洗脱、分离和分析;

(viii)一种方法用于分离和鉴定蛋白质。根据本发明，这些蛋白质能够结合于胞内区结合蛋白。该方法包括应用酵母双－杂种(yeast two-hyhrid)方法，其中编码所说的胞内区结合蛋白的序列由一个杂种载体携载，以及另一来自ｃＤＮＡ或基因组文库的序列并由第二杂种载体（second hyhrid vector)携载，这些载体然后被用来转化酵母宿主细胞。分离这些阳性转化细胞并随后提取所说的第二杂种载体而得到一序列，它编码的蛋白质可结合于所说的胞内区结合蛋白；以及

（ix）一种方法，用于分离和鉴定能够结合于ＴＮＦ－Ｒs或ＦＡＳ－Ｒ的胞内区的一种蛋白质，包括应用温和Sourthern杂交（nonstringent southern hybridization)，随后进行ＰＣＲ扩增。根据本发明，用其中一序列或其一部分作探针（probe)在ｃＤＮＡ或基团组文库中，钓出至少有部分同源性的序列。将所说的同源序列，ＰＣＲ扩增，便可得到大量与所述序列有同源性的蛋白克隆。

本发明还提供了一种药物用于调节ＴＮＦ或ＦＡＳ配基对细胞的作用，包含作为活性组分的以下任何一种物质：（ｉ）本发明所述的一种蛋白质，或者蛋白质Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ或ＦＡＳ－ＤＤ，或它的生物活性片段、类似物、衍生物或它们的混合物，（ii）一种编码病毒外壳蛋白的重组动物病毒载体，该外壳蛋白能结合ＴＮＦ－Ｒ或ＦＡＳ－Ｒ携载的细胞受体或肿瘤细胞的特定受体；和编码本发明述及的一种蛋白质、类似物或衍生物或者编码Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ或ＦＡＳ－ＤＤ蛋白的一段序列；（iii）一种重组动物病毒载体，编码如上述（ii）中所说病毒外壳蛋白，以及P55IC、P55DD、FAS-

IC或FAS-DD编码序列的反义寡核苷酸序列；以及(iv)一种编码核酶载体，该核酶能与编码本发明述及的蛋白质，类似物或衍生物等的mRNA序列以及编码P55IC、P55DD、FAS-IC或FAS-DD的mRNA序列进行相互作用。

本发明上述各方面的一特定实例是P55-IC的使用或编码其自身的DNA序列的使用。本实施例是基于P55IC能以不依赖配基（TNF）的方法诱导细胞中的TNF-相关效应。因而提供了一种方法，用于诱发细胞或组织中的TNF-相关效应，包括用一种或一种以上的蛋白质或其类似物或衍生物处理所说的细胞，所说的蛋白质是选自这样一类蛋白质，它实质上全部属于P55TNF-R的自缔合胞内区（P55-IC）或其一部分，并能以不依赖配基的方式诱导所说的细胞内的TNF效应，其中所说的细胞处理包括将所说的一种以上的蛋白质、类似物或衍生物以适合于胞内引入的形式引入所说的细胞中，或将一段编码一种以上的蛋白质、类似物或衍生物DNA序列用合适的载体引入所说的细胞中，其中载体能够完成目的序列嵌入靶细胞的过程，随之，目的序列即可在靶细胞中表达。

本发明上述方法的实施例包括:

（i）一种方法，其中所说的细胞处理是用一种重组动物病毒载体转染细胞，包括如下步骤:

（a）构建一种载有可编码为病毒外壳蛋白（配基）序列的重组动物病毒载体，该蛋白能结合于要处理的细胞表面上的特定细胞表面受体。该载体还载有第二序列，它编码P55-IC，或其片段、类似物和衍生物。这些蛋白质在细胞表达后能自缔合，并能诱导一系列TNF-相关效应；以及

（b）用（a）中的载体感染所说的细胞。

（ii）一种方法，其中所说的在细胞中诱导TNF效应，是指IL-8基因表达的诱导，所说的载体载有一序列、实质上它编码所有所说的P55-IC，或其一部分、及其类似物和衍生物。当在细胞表达时，它们能自缔合并发出信号，诱发IL-8基因表达。

（iii）一种方法用于处理肿瘤细胞或病毒感染细胞，或用于增加粒细胞的抗菌作用，其中所说的病毒载体载有一编码病毒配基的序列，该配基能结合肿瘤细胞、病毒感染细胞及粒细胞的特定细胞表面受体。它还载有编码P55-IC或其一部分、类似物及衍生物序列，当它们在肿瘤细胞中，病毒感染了的细胞或粒细胞中表达时便诱发TNF缔合效应而导致这些细胞死亡。

（iv）一种方法用于处理肿瘤物或衍生物，当在肿瘤细胞表达时，可诱发IL-8的表达而导致肿瘤细胞的死亡。杀细胞是通过它的“趋化活性”，即吸引粒细胞和其它淋巴细胞到肿瘤细胞上而导致肿瘤细胞死亡。

在本发明的这一方面，还提供了P55-R、其一部分、类似物及衍生物的胞内区（P55-IC）在处理细胞中的应用，即可诱导TNF-缔合效应；并且提供了如下实施例:

（i）P55-IC，其部分、类似物及衍生物，用于处理细胞来诱导IL-8基因表达。

（ii）P55-IC，其部分、类似物及衍生物，用于处理肿瘤细胞，通过诱导IL-8基因表达，杀死肿瘤细胞。

进一步，在本发明的这方面，提供了能诱发TNF-相关效应的一种药物组合物。包括P55-IC、其部分、类似物及衍生物作为活性成分，以及一种医药上可接受的载体（carrier)；以及它们的如下实施例:

（i）一种可诱导TNF-相关效应的药物组合物，包括作为活性组分的重组动物病毒载体它编码为P55-IC、其部分、及其类似物和衍生物、以及能够结合要处理的细胞表面蛋白的蛋白质。

（ii）一种药物组合物，当处理肿瘤细胞，它可诱导IL-8表达并随之杀死肿瘤细胞。

另一方面，本发明提供了一种可溶性的、寡聚肿瘤坏死因子受体（TNF-R），包括至少两种自-缔合融合蛋白，每一融合蛋白具有:（a）在其一末端，-TNF结合区，它来自TNF-R、类似物或衍生物的胞外区，并且它们不影响其自-缔合作用且能结合TNF；及（b）在其另一末端，一自-缔合区，来自:（i）实质上是P55TNF-R的所有

胞内区(P55-IC)，即从天然Ｐ５５ＴＮＦ－Ｒ分子（Ｐ５５－Ｒ）的大约第 ２０６个氨基酸残基一直到第４２６个氨基酸残基；（ｉｉ）Ｐ５５－ＩＣ的死亡功能域，从天然Ｐ５５－Ｒ的大约第３２８个氨基酸残基一直到大约第４２６个氨基酸残基；（ｉｉｉ）实质上是ＦＡＳ/ＡＰ０１受体的所有胞内区（ＦＡＳ－ＩＣ）；（ｉｖ）Ｆａｓ－ＩＣ的死亡功能域；以及（ｖ）（ｉ）－（ｉｖ）中能自缔合的任何一种的类似物、其一部分或衍生物，其中两个自一缔合蛋白仅在其末端（ｂ）能够产生自－缔合作用。它具有的（ａ）末端能结合至少两种ＴＮＦ单体，每一（ａ）末端能结合一个ＴＮＦ单体、及所说可溶性寡聚ＴＮＦ－Ｒ的盐类及功能衍生物。

本发明这方面的一些实施例，还包括所有上述（ａ）末端与（ｂ）末端的结合体，如上所定义的，例如，一种可溶性的寡聚ＴＮＦ－Ｒ，包括作为胞外区的Ｐ５５－Ｒ胞外区，和作为自－缔合胞内区的Ｐ５５－ＩＣ。

进一步，还提供了一种生产本发明的可溶性寡聚物ＴＮＦ－Ｒ的工艺方法，包括:

（ａ）构建一个表达载体，它编码融合蛋白的任何一种组份，其每段ＤＮＡ序列都来自ＴＮＦ－Ｒ的胞外区、类似物或衍生物ＤＮＡ序列的克隆系；以及来自编码Ｐ５５－ＩＣ、Ｐ５５－ＩＣ死亡功能域、Ｆａｓ－ＩＣ、Ｆａｓ－ＩＣ死亡功能域、及其它们类似物或衍生物ＤＮＡ序列的克隆系,其各末端可相互连接形成融合蛋白质序列。并且所说的融合蛋白序列可在转录和翻译调节序列的调节下嵌入所说的载体;

（ｂ）将（ａ）中的载体导入合适的宿主细胞，所说的融合蛋白在该宿主细胞中被表达，以及

（ｃ）纯化宿主细胞中表达的融合蛋白，该融合蛋白在纯化之前、纯化过程中或纯化之后均是可自－缔合的，并且产生可溶性的寡聚物ＴＮＦ－Ｒ。

进一步还提供了如下内容：一种编码上述融合蛋白的载体，它在本发明的上述方法中被广泛使用；含上述载体的宿主细胞；以及一种药物组合物，其中含有可溶性的寡聚ＴＮＦ－Ｒ及其盐类、功能衍生物以及一种前

述物质的混合物，作为活性成分，它们与病理上可接受的载体结合在一起；同时提供了一些可溶性的寡聚ＴＮＦ－Ｒ及其盐类、功能衍生物，以及前述物质混合物，用于拮抵ＴＮＦ在哺乳动物体内的有害作用，特别用于治疗这样的病症，即因内生或外源施用造成ＴＮＦ过量；或者是另一种情况下，当ＴＮＦ以外源施用时，用于保持ＴＮＦ在哺乳动物体内的长时间有利作用。

根据本发明上述所列条款，还发现，有可能制得一种可溶性寡聚物Fas/ＡＰ０１受体（Ｆas－Ｒ），用于拮抗ＦＡＳ配基的有害作用。据此，本发明在另一方面提供了一种可溶性的寡聚Fas/ＡＰ０１受体（Ｆas－Ｒ），含有至少两种自－缔合了的融合蛋白，每一融合蛋白具有：（ａ）在它的一末端，是Fas配基结合区，该结合区是来自Ｆas－Ｒ、其类似物或衍生物的胞外区，它不能自－缔合但能够结合Fas配基；以及（ｂ）在其另一末端，是自－缔合区，来自：（ｉ）实质上是Ｐ５５ＴＮＦ－Ｒ的全部胞内区（Ｐ５５－ＩＣ）即从天然Ｐ５５－ＴＮＦ－Ｒ分子（Ｐ５５－Ｒ）的约第２０６个氨基酸残基到约第４２６氨基酸残基之间的区段；（ii）Ｐ５５－ＩＣ的死亡功能域，即从天然Ｐ５５－Ｒ的约第３２８个氨基酸残基到约第４２６个氨基酸残基之间的区段；（iii）实质上是Fas/APO1受体的全部胞内区（Ｆas－ＩＣ）；（iv）Ｆas－ＩＣ的死亡功能域；以及（ｖ）（ｉ）－（iv）中所述蛋白的类似物或衍生物，它们能够产生自－缔合作用，其中至少两种自－缔合了的蛋白仅在（ｂ）末端能够自－缔合，它们的末端能够结合至少两个Fas配基单体，并且每一(a)末端能够结合一个Fas配基单体；以及可溶性的寡聚Ｆas－Ｒ的盐类和功能衍生物。

根据本发明的这一方面，还提供了一生产可溶性寡聚Ｆas－Ｒ的方法，包括：

（ａ）构建可对融合蛋白的任何组份给予编码的表达载体，融合蛋白的每一末端的ＤＮＡ序列均来自这样的ＤＮＡ克隆系，即实质上编码全部Ｆas－Ｒ、其类似物或衍生物的胞外区，以及来自这样的ＤＮＡ克隆系，即它们实质上编码全部Ｐ５５－ＩＣ、Ｐ５５－ＩＣ死亡功能域、Ｆas－

ＩＣ、Ｆas－ＩＣ死亡功能域以及所有前述蛋白的类似物或衍生物，其各末端能够相互连接而形成融合蛋白编码序列，并且，融合蛋白编码序列是在转录和翻译调节序列的调控下嵌入所说的载体；

（ｂ）将（ａ）的载体导入合适的宿主细胞，所说的融合蛋白表达于该宿主细胞中；以及

（ｃ）表达于该宿主细胞中的融合蛋白的纯化，所说的融合蛋白质在纯化过程之前、之中或之后均能自－缔合而得到可溶性的寡聚Ｆas－Ｒ。

更进一步，还提供了一种表达载体，它载有编码可溶性寡聚Ｆas－Ｒ的融合蛋白编码序列，并被广泛用于上述过程；还提供了一种载有该载体的宿主细胞以及一些药物组合物，该药物组合物含有可溶性寡聚Ｆas－Ｒ及其盐类或衍生物或前述任何一种的混合物，作为活性成分，它们与病理上可接受的载体结合在一起。同时，还提供了一种可溶性寡聚Ｆas－Ｒ及其盐类或功能衍生物或前述任何一种物质的混合物，用于拮抗Ｆas配基对哺乳动物的有害作用，特别定用于处理由内生或外源施用造成的Ｆas配基过量形成的一些病症。

用与上述关于寡聚TNF-Ｒs和寡聚Ｆas－Ｒs的相似方式，还可能制得一些同时对ＴＮＦ和Ｆas－Ｒ配基具有结合专一性的混合寡聚物。据此本发明还提供了一种混合寡聚ＴＮＦ－Ｒ/ＦＡＳ－Ｒ，它含有至少两种自－缔合了的融合蛋白，其中一种融合蛋白是来自上述ＴＮＦ－专一性融合蛋白的任何一种，另一融合蛋白来自上述ＦＡＳ－Ｒ配基专一性融合蛋白质，从而提供一种混合寡聚物，它具有至少一个ＴＮＦ－Ｒ胞外区和至少一个ＦＡＳ－Ｒ胞外区，这些胞外区凭借与其结合的各胞内区相互间的自－缔合作用而缔合在一起。这些混合寡聚受体的制备，如上所述，是先制备寡聚物ＴＮＦ－Ｒs和寡聚物ＦＡＳ－Ｒs，然后将它们一起混合，随后按照常规程序选择能够专一结合ＦＡＳ－Ｒ配基和ＴＮＦ的寡聚物。另一种制取混合寡聚受体的方法，如上所述，是用一些载体共转染(co-transfecting)合适的宿主细胞，该载体可编码任何一个ＴＮＦ专一性融合蛋白（可溶性ＴＮＦ－Ｒs）和编码任何一个ＦＡＳ－Ｒ配基专一性融合蛋白（可溶性ＦＡＳ－Ｒs）。然后纯化，表达融合蛋白，并且它在纯化之

前、之中或之后均能自缔合而得到一些寡聚受体，然后按照常规工序选择这些能够结合于ＴＮＦ和ＦＡＳ－Ｒ配位体的寡聚受体。

同样 ，还提供了一种药物组合物，包括作为活性成分的混合寡聚受体、它们的盐或功能衍生物 ，或者前述物质的混合物，它与一种药理上可接受的载体结合在一起。此外 ，还提供了一些混合寡聚物受体、它们的盐类或功能衍生物 ，或者任何前述物质的混合物 ，用于拮抗哺乳动物体内ＴＮＦ和ＦＡＳ－Ｒ配基的有害作用 ，特别用于处理这样的病症 ， 即由于内生或外源施用形成过量的ＴＮＦ和ＦＡＳ－Ｒ配基 ， 或者另外也用于保持哺乳动物体内ＴＮＦ和/或ＦＡＳ－Ｒ配基的长时间的有利作用 ，例如当它们与ＴＮＦ和/或ＦＡＳ－Ｒ配基（以可溶形式）一起在体外施用时。

本发明还提供了另外一些方面和实施例详述如下。

应当指出，全文中所使用的如下术语：“ＴＮＦ对细胞的调节作用”和“Ｆas配基对细胞的调节作用”，应理解为包括在体外和体内处理。

附图简述

图１ａ－ｃ以图表描述了编码Ｐ５５ＩＣ和Ｐ７５ＩＣ－结合蛋白的一些ｃＤＮＡ克隆的部分基本的核苷酸序列，其中图１（ａ）是编码Ｐ５５ＩＣ－结合蛋白５５．１１的克隆５５．１１序列(SEQ ID NO:9)；图１（ｂ）是编码Ｐ７５ＩＣ－结合蛋白７５．３的克隆７５．３的部分基本序列(SEQ ID NO:10和11)；以及图１（ｃ）是编码Ｐ７５ＩＣ－结合蛋白Ｐ７５．１６的克隆７５．１６部分基本序列(SEQ ID NO:12和13)；所有这些均如例１所描述；以及图１（ｄ）描述了蛋白质５５．１１氨基酸推断序列(SEQ ID NO:14)，而蛋白５５．１１是从图１（ａ）的核苷酸序列推断的，在实施例１中也进行了描述。

图２描述了Northern印迹法检测结果，它表明５５．１１专一的mRNAs是存在于多种测试过的细胞系的，如例１所述。

图３Ａ和３Ｂ是放射自显影检测结果，它表明编码５５．１１ｃＤＮＡ的蛋白在体外结合于含部分Ｐ５５－ＩＣ的ＧＳＴ融合蛋白质的情况，其中图３Ａ描述了全长度５５．１１蛋白质（５５．１１全长）结合于各种ＧＳＴ融合蛋白的情况；图３Ｂ描述了融合于ＦＬＡＧ八肽的部分５５．１１

结合于各种ＧＳＴ融合蛋白的情况，全部描述于实施例１。

图４是表示人类５５．１１蛋白的推断氨基酸序列与低等生物的有关蛋白序列的图表比较，如实施例１所述。

图５是Western印迹法检测结果，即用抗－ＭＢＰ多克隆抗血清染色，这是为了说明Ｐ５５ＩＣ的自缔合作用，当进行ＳＤＳ－ＰＡＧＥ凝胶电泳时，基于细菌产生的嵌合蛋白Ｐ５５ＩＣ－ＭＢＰ与Ｐ５５ＩＣ－ＧＳＴ的相互作用（泳道１－４）、或者嵌合蛋白Ｐ５５ＩＣ－ＭＢＰ与单独ＧＳＴ之间的调控作用，（泳道５－８），而得到Western印迹。而对嵌合蛋白彼此间的相互作用，在ＳＤＳ－ＰＡＧＥ电泳之前，在谷胱甘肽－琼脂（胶）糖凝胶上进行电泳研究的，如实施例２中所述。

图６是相差显微镜检测结果，说明在编码Ｐ５５ＩＣ的表达载体转染HTtal细胞中，全长Ｐ５５的ＩＣ细胞毒性效应（右图片），以及说明这种细胞毒性效应的抑制作用，即通过用四环素处理细胞使该载体的表达被封闭时的情况（左图片），如实施例２中所述。

图７描述了被Ｐ５５－Ｒ或其胞内区，或部分胞内区包括“死亡功能域”转染了的Hela细胞（人宫颈癌传代细胞）后杀细胞效应的不依赖配基的触发作用。其中

（ｉ）在图７的最左边描述了编码全长Ｐ５５－Ｒ，它的胞内区及部分胞内区的各种ＤＮＡ序列，并且此序列被插入载体，用于转染Hela细胞；

（ｉｉ）左边和中间的条形图，是说明ＴＮＦ受体在Hela细胞中的表达，即在图７最左边所示每种类型受体在hela细胞中的表达，左边条形图代表受体的量（ng/细胞样品），中间条形图代表以结合于转染细胞的放射性碘化ＴＮＦ来表示的受体的量，以及

（ｉｉｉ）右边条形图，是说明表达各种受体的Hela细胞的存活力；其中在所有的条形图中，一些开放栏是代表在四环素存在下转染的细胞，而封闭栏是代表无四环素存在下转染的细胞；此处所有描述均见实施例２。

图８说明ＩＬ－８基因的不依赖于配基诱导作用，该基团表达于被Ｐ５５－Ｒ或其胞内区（Ｐ５５ＩＣ）转染了的Hela细胞中，其中图８Ａ

表示Northern印迹法检测结果。其中ＲＮＡ提取自用ＴＮＦ处理或未处理过的Hela细胞（两行左边泳道分别标记有对照和ＴＮＦ者），以及提取自被编码Ｐ５５－Ｒ，Ｐ５５－ＩＣ的载体转染了的Hela细胞或提取自对照蛋白虫萤光素酶（分别标记有Ｐ５５－ＩＣ、Ｐ５５－Ｒ及Luc的其余各泳道），该Hela细胞是在四环素存在下（＋）或不存在下（－），分别进行转染（因此每一转染有两行泳道）；其中图８Ｂ表示对图Ａ中所示每个Hela细胞样品中的１８ｓｒＲＮＡ给予亚甲兰染色；所有上述均见于实施例２中。

图９（Ａ和Ｂ）以图示描述了在Hela细胞中的杀细胞效应的不依赖配基的触发作用。Hela细胞用Ｐ５５Ｒ或其部分，或用ＦＡＳ－ＩＣ进行转染，其中图９描述了用Ｐ５５Ｒ或其部分感染Hela细胞后的结果，图９Ｂ描述了用ＦＡＳ－ＩＣ感染细胞后的结果。

在图９Ａ和Ｂ的左侧图示了用于转染的部分Ｐ５５Ｒ或ＦＡＳ－ＩＣ，而右边图示了一些实验结果，所有这些均在实施例２中作了描述。

图１０是以图式描述了名叫“Ｆ２”的一种ｃＤＮＡ克隆的部分基本核苷酸序列(SEQ ID NO:19和20)，它编码能结合于Ｐ５５ＩＣ和ＦＡＳ－ＩＣ的一种蛋白质，如实施例３中所述。

图１１是以图式描述了名叫“Ｆ９”的一种ｃＤＮＡ克隆的部分基本核苷酸序列(SEQ ID NO:21-23)，它编码能结合于Ｐ５５ＩＣ和ＦＡＳ－ＩＣ的一种蛋白质，如实施例３所述。

图１２是以图式描述了名叫“ＤＤ１１”的一种ｃＤＮＡ克隆的部分基本核苷酸序列(SEQ ID NO:24)，它编码能结合于Ｐ５５ＩＣ，特别是Ｐ５５ＤＤ和ＦＡＳ－ＩＣ的一种蛋白质，如实施例３所述。

发明的详细描述

本发明在一个方面是关于能结合于受体胞内区的一些新型蛋白质，其中这些受体属于ＴＮＦ/ＮＧＦ超家族，例如ＴＮＦ－Ｒs和ＦＡＳ－Ｒ，因而这些蛋白质可以考虑作为该超家族受体例如ＴＮＦ－Ｒs和ＦＡＳ－Ｒ的中介体(mediators)或调节剂，并且这些受体在由于ＴＮＦ结合于ＴＮＦ－Ｒs和ＦＡＳ配基结合于ＦＡＳ－Ｒ而引起信号产生过程中，具有某种

作用。这些蛋白质是指能够结合于P55TNF-R胞内区的蛋白（P55IC），例如这里定名为55.1，55.3及55.11的一些蛋白质（实施例1）以及按照cDNA克隆F2，F9及DD11编码的一些蛋白质（实施例3）；能够结合于P75TNF-R胞内区的蛋白（P75.IC），例如定名为75.3和75.16的一些蛋白质（实施例1）；以及能够结合于FAS-R胞内区的一些蛋白（FAS-IC），例如按照cDNA克隆F2、F9及DD11编码的一些蛋白质（实施例3）。蛋白质55.1和55.3已发现即为P55TNF-R的胞内区的一些部分或片段（P55IC）；其它蛋白质55.11，75.3及75.16则代表在本发明之前未见任何报道的蛋白质（75.3，75.16），或者对它们虽有报道（55.11，参见khan等，1992），但对其功能和其他特性，特别是能够结合于TNF-R，却没有任何方面的描述（参见下面实施例1）。这些按照cDNA克隆F2，F9及DD11编码的一些新型蛋白，也代表以前尚未报道的蛋白，亦即它们的序列未存入DNA或氨基酸序列的“基团数据库”（GENEBANK）或“蛋白质数据库”(PROTEIN BANK)。

因而，本发明是关于由这些序列编码的蛋白质，以及编码这些蛋白的DNA序列。

而且，本发明还涉及一些DNA序列，它们编码这些蛋白质的具有生物学活性的类似物及衍生物，以及由它们编码的类似物与衍生物。这些类似物和衍生物的制备是按照常规操作步骤（例如参见Sambrook等，1989），其中在编码这些蛋白质的DNA序列中，有一个以上的密码子缺失，增加或被另一个密码子所替找，而得到一些类似物，这些类似物与天然蛋白质相比至少有一个氨基酸残基的变化。受欢迎的类似物如P55IC、P75IC或FAS-IC，必需保留至少能结合于TNF/NGF受体超家族的胞内区的能力，例如FAS-R或TNF-R的胞内区，或者能够介导任何其他结合过程或酶活性，例如这样一些类似物，即它们能够结合P55IC、P75IC或FAS-IC，但不会产生信号，亦即不能进一步结合下游受体（further downstream receptor）、蛋白质或

其它因子，或者说不能催化某种信号－依赖性反应。用这样的方法便能生产一些类似物，它们具有所谓的显性－负效应 (dominant-negative effect)，亦即在结合于例如Ｐ５５ＩＣ、Ｐ７５ＩＣ或ＡＦＳ－ＩＣ，或随着结合而在以后的信号产生过程中，该类似物都是有缺陷的。这些类似物，通过与天然ＩＣ－结合蛋白竞争结合可用来抑制ＴＮＦ的作用或ＦＡＳ－配基的作用。同样，也可生产所谓的显性－正效应类似物（dominant-positive analogs），它们可用来增强ＴＮＦ效应或ＦＡＳ配位效应。它们与天然ＩＣ－结合蛋白质相比有相同的或更好的ＩＣ－结合性能，以及相同的或更好的信号应答性能。同样，通过用常规修饰技术改变蛋白质的一个或多个氨基酸残基的侧基，或者通过扼合蛋白质于另一分子，例如抗体、酶、受体等、也可以制得一些衍生物，正如在已有技术所述。

这些新型ＴＮＦ－Ｒ和ＦＡＳ－Ｒ胞内区结合蛋白，例如蛋白５５.１，５５.３，５５.１１，７５.３，７５.１６以及按照cＤＮＡ克隆Ｆ２，Ｆ９及ＤＤ１１编码的蛋白质（以下叫做Ｆ２，Ｆ９和DD11），均有许多可能的用途，例如:

（ｉ）当需要增加ＴＮＦ或ＦＡＳ－Ｒ配基的作用时，例如在抗肿瘤、抗发炎或抗ＨＩＶ等临床应用时即需要ＴＮＦ或ＦＡＳ－Ｒ配基诱发细胞毒性时，它们可用于模拟或增强ＴＮＦ或ＦＡＳ－Ｒ配基的功能。在此情况下的蛋白质，例如能结合于Ｐ５５ＩＣ的蛋白质，象５５.１，５５.３，以及Ｆ２，Ｆ９和ＤＤ１１等蛋白质，以及能增强ＴＮＦ效应的游离Ｐ５５ＩＣ本身（参见以下和实施例2），及Ｐ５５ＩＣ的“死亡功能域”，或能增强ＦＡＳ－Ｒ配位效应即细胞毒性效应的蛋白质Ｆ２，Ｆ９及ＤＤ１１以及ＦＡＳ－ＩＣ和ＦＡＳ－ＤＤ，均可按照已知的常规方法引入细胞。例如，因这些蛋白质是胞内的，并且将其引入到需要ＴＮＦ效应或ＦＡＳ－Ｒ配位效应的细胞中是受欢迎的，所以建立一种将这些蛋白特异地引入细胞中的体系是需要的。为达到此目的,有一种方法，是通过制造一种重组动物病毒，例如一种牛痘病毒,向其ＤＮＡ导入以下两种基因:一种是编码配基的基因，该配基能结合于由细胞特异表达的细胞表面蛋

白，例如ＡＩＤｓ（ＨＩＶ）病毒gp１２０蛋白，能专一性结合于某些细胞（ＣD４淋巴细胞和有关的白血病），或者能专一性结合于载有ＴＮＦ－Ｒ或ＦＡＳ－Ｒ的细胞的任何一种配基，这样重组病毒载体便能够结合载有TNF-Ｒ或ＦＡＳ－Ｒ的细胞；另一种是编码新型胞内区－结合蛋白或Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ或ＦＡＳ－ＤＤ蛋白的基因。这样，细胞表面结合蛋白在病毒表面上的表达将使病毒把肿瘤细胞毒或其它载有ＴＮＦ－Ｒ或ＦＡＳ－Ｒ的细胞当做专一性的靶细胞，此后便可通过病毒将胞内区结合蛋白编码序列或Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ或ＦＡＳ－ＤＤ编码序列引入细胞，并且它们一旦在细胞中被表达，即可增强ＴＮＦ效应或ＦＡＳ－Ｒ配位效应而导致肿瘤细胞的死亡或导致载有ＴＮＦ－Ｒ或ＦＡＳ－Ｒ的细胞的死亡。按照常规操作程序（例如参见Sambrook等人，１９８９），可构建这种重组动物病毒。另一种可能，将新型蛋白质编码序列或Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ或FAS-ＤＤ以寡核苷酸序列形式导入细胞并使其在细胞中表达。

（ii）它们可用来抑制ＴＮＦ或ＦＡＳ－Ｒ配基的作用。例如在因败血体克、移植体－对－宿主排斥(graft-vs-host rejection)，或急性肝炎引起的组织损坏中，需封闭ＴＮＦ－诱发的ＴＮＦ－Ｒ或ＦＡＳ－Ｒ配基诱发的ＦＡＳ－Ｒ的胞内信号传导过程。例如，用常规操作方法将编码新型蛋白的反义（anti-sense)序列，或编码Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ或ＦＡＳ－ＤＤ的反义寡核苷酸序列导入细胞，则能有效地封阻编码蛋白质的ｍＲＮＡｓ的翻译和表达，最终抑制ＴＮＦ效应或ＦＡＳ－Ｒ配位效应。

这样的寡聚核苷酸，可用上述重组病毒的方法，即由病毒携载第二寡核苷酸序列，而引入细胞中。另一可能性是利用这些蛋白的专一性抗体，来抑制其胞内信号传导活性。还有这样的可能性：这些新型蛋白质具有胞外区以及胞内区，胞内区可结合于ＴＮＦ－Ｒ或ＦＡＳ－Ｒ的结合区，而产生的抗体可结合于它们的胞外区，从而封阻它们的ＴＮＦ有关功能或ＦＡＳ－Ｒ配基有关功能。

还有另一种抑制ＴＮＦ效应或ＦＡＳ－Ｒ配位效应的方法，是按照最

近发展的核酶途径。核酸是具有催化活性的ＲＮＡ分子能特异性地切开ＲＮＡ分子，因此它可有目的性的选择水解靶ＲＮＡＳ，例如编码本发明的新型蛋白的mＲＮＡs，或者编码Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ或ＦＡＳ－ＤＤ的mＲＮＡ,均可作为靶ＲＮＡs。这种核酶可识别特定的mＲＮＡ的特定序列，并在mＲＮＡ裂解之后能与其相互作用（互补结合），结果便减少（或完全消失）了需要抑制的蛋白的表达量，减少程度（水平），决定于核酶在靶细胞中的表达程度。为了将核酶引人靶细胞中（例如载有ＴＮＦ－Ｒs或ＦＡＳ－Ｒ的细胞中），可使用各种合适的载体（vector)，例如质粒、动物病毒（逆转录病毒）载体。（参见(ｉ)所述，其中病毒具有编码目的核酶的cDNA序列作为第二序列）。而且，核酶经构建，便具有多重靶底物（多靶核酶），可用来抑制本发明中多种蛋白的表达和或Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ或ＦＡＳ－ＤＤ等蛋白的表达（有关核酶的综述方法等可参见chen等,1992;Zhao and pick, 1993; Shore等,1993;Joseph and Burke, 1993;以及 Koizumi等,1993)。

（iii）它们可用来分离、鉴定和克隆能结合于与胞内信号产生过程相关的一些其它蛋白质，这些蛋白是ＴＮＦ－Ｒ或ＦＡＳ－Ｒ胞内区的下游（downstream)。在此情况下，编码这些蛋白的ＤＮＡ序列可用于酵母双杂种系统（(yeast two-hybrid system)（见以下实施例1），即这些序列将被用作“诱饵”(baits) 从cＤＮＡ文库或基因组文库中来分离、克隆和鉴定能够结合于这些新型ＴＮＦ－Ｒ或ＦＡＳ－Ｒ的胞内区结合蛋白的蛋白编码序列。以此方法，便有可能确定本发明的特异蛋白，亦即结合于Ｐ５５ＩＣ、Ｐ７５ＩＣ、或ＦＡＳ－ＩＣ的蛋白，是否能够结合于ＴＮＦ/ＮＧＦ受体超家族的其它受体，例如，最近报道(schwalb等，１９９３；Baen等，１９９３；Crowe等，１９９４），除Ｐ５５和Ｐ７５ＴＮＦ－Ｒs之外还存在其它ＴＮＦ－Ｒs。因而，利用酵母双杂种系统可特异性地测试本发明的一些蛋白是否能够专一结合于ＴＮＦ/ＮＧＦ超家族的其它ＴＮＦ－Ｒs或其它受体。而且，这种方法也可用来测定本发明的一些蛋白质是否能够结合于其它有功能活性的已知受体。

（iV）这些新型蛋白质可用来分离、鉴定和克隆与其同属的其它蛋

白，即能结合于ＴＮＦ－Ｒ或FAS-Ｒ胞内区或功能上有关的受体，以及与胞内信号产生过程相关的一些蛋白质。在此应用中，可使用上述酵母双－杂种系统，或可使用一种最近发展起来的（wilks等，１９８９）系统，即利用不严紧Southern杂交(non-stringent southern hybridization)，然后ＰＣＲ扩增。在Wilks等的文章中，曾经描述了两种公认的酪氨酸蛋白激酶（kinase）的鉴定和克隆方法，据该激酶某功能区的已知序列，即一种设想的激酶序列，通过应用不严紧Southern杂交，然后ＰＣＲ扩增。根据本发明利用新型蛋白序列，这种方法可用来鉴定和克隆与ＴＮＦ－Ｒ、ＦＡＳ－Ｒ相关的蛋白序列，或与受体（ＴＮＦ/ＮＧＦ超家族受体）胞内区结合蛋白相关的序列。

（v）还有另一种途径来利用本发明的新型蛋白质，即将它们用于亲合色谱中来分离和鉴定其它能与它们结合的蛋白质或因子，例如分离和鉴定有关于ＴＮＦ－Ｒs（ＴＮＦ/ＮＧＦ受体超家族）的其它受体，或涉及胞内信号产生过程的其它蛋白质或因子。在此应用中，本发明的新型蛋白质可分别附着于亲合色谱基质上，然后使其与细胞提取物或分离出的蛋白质或因子相接触，所说的因子被推断参与了胞内信号产生过程。随着亲合层析的进行，结合于本发明新型蛋白质的其他蛋白质或因子，能被洗脱、分离和鉴定。

(vi)如上面所指出，本发明的新型蛋白质还可用作免疫原（抗原）来生产其专一性抗体。这些抗体也可用于从来自于细胞提取物或生产它们的转化细胞系中纯化这些新型蛋白质。并且，这些抗体可用于诊断目的，即用于鉴定与ＴＮＦ或ＦＡＳ－Ｒ配基系统功能失常相关的一些疾病，例如活性过高或活性过低的ＴＮＦ或ＦＡＳ－Ｒ配基诱导的细胞效应。因此，如果这些疾病与新型蛋白胞内信号系统功能失调有关，那么这些抗体即可作为一种重要的疾病诊断工具。

还应当指出，本发明的新型蛋白质的分离、鉴定和表征，可使用任何一种已知常规筛选方法。例如酵母双杂种法，在以下实施例（实施例１和例３）中将作描述，被用来鉴定本发明的新型蛋白质。同样如上面和下面所述，其它一些方法例如亲合色谱法，ＤＮＡ杂交法，也可用于分离、鉴

定和表征本发明的新型蛋白质，或者用于分离、鉴定和表征补充的蛋白质、因子、受体等，这些蛋白、因子、受体能够结合于本发明的新型蛋白质或结合于ＴＮＦ/ＮＧＦ受体家族中的一些受体。

关于此处上下文所提到的抗体 ， 术语“抗体”包括对一些抗体的多克隆抗体 、单克隆抗体(mABs)、嵌合抗体、抗特异型(anti-idiotypic,简写为anti-Id)抗体，它们可以可溶态或结合态或以由已有技术生产的片段形式来被标记。例如通过酶裂解、肽段合成或重组技术等来被标记。

多克隆抗体是来自以抗原免疫的动物血清中的异种抗体分子。单克隆抗体包括对某些抗原具特异性的一类同源抗体，即实质上它们具有相似的表位(epitope)结合位点。MAbs（单克隆抗体），可以利用本领域人员熟知的方法制得。例如参见Kohler and Milstein,《Nature》,256:495-497(1975);美国专利NO.4,376,110;Ausubel等编辑,Harlow and Lan ANTIBODIES:实验手册，冷泉港实验室(1988);以及Coligan等编辑，免疫通用程序,Greenes publishing Assoc. and Wiley Interscience N.Y.,(1992,1993),这些文章的目录全部作为参考文献引人说明书。这些抗体可能属于IgG、IgM、IgE、IgA、GILD的免疫球蛋白族及其亚族。一种生产本发明的mAB的杂交瘤可以在体外培养、或原位培养或在活体内培养。在活体内或原位培养能生产高效价mAbs,所以它们是目前生产这种mAbs的优选方法。

嵌合抗体是一些不同部分衍生自不同动物种类的抗体分子，例如一类可变区来自鼠类mAb和人类免疫球蛋白恒定区的抗体分子。嵌合抗体主要用来减低免疫原性和用来增加生产收率，例如鼠mAbs具有来自杂交瘤的较高收率，但在人体内却有较高的免疫原性，因而人/鼠嵌合mAbs是经常使用的嵌合抗体。该嵌合抗体的生产方法，在技术上已被众人所熟知(Cabilly等,Proc. Natl Acad.Sci. USA 81:3273-3277(1984) ; Morrison等,Proc. Natl. Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984);Boulianne等,Nature 312:643-646(1984); Cabilly等,European Patent Application 125023(Published November 14,1984) ; Neuberger等 , Nature 314:268-270(1985);

Taniguchi 等 , European Patent Application 171496(Published February 19, 1985); Morrison 等 ,European Patent Application 173494(Published March 5, 1986); Neuberger等, PCT Application WO 8601533 (Published March 13,1986); Kudo 等 ,European Patent Application 184187(Published June 11,1986); Sahagan 等,J. Immunol. 137: 1066-1074(1986);Robinson等, International Patent Application NO.WO 8702671(Published May 7, 1987); Liu 等 ,Proc. Natl. ACad. Sci. USA 84: 3439-3443(1987);Sun 等 ,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218(1987); Better 等 ,Science 240: 1041-1043(1988); 以及Harlow and Lane, Antibodies: a laboratory Manual, Supta。这些文章全部作为参考文献目录引人说明书中。

抗－特异型(Anti-idiotypic,缩写为Anti-Id)抗体，是指能够识别与抗体的抗原－结合部位相关的独特型决定族(determinants)。Id抗体的制备，可通过用MAb免疫作为MAb源的相同种和相同基因型的动物（例如老鼠种类）而实现。该免疫的动物通过产生一种对这些特异型决定子具特异性的抗体（抗－Id抗体），来识别或应答这些免疫抗体。请参见例如美国专利NO. 4,699,880,本文中作为参考文献全部引人。

抗－Id抗体还可作为一种"免疫原"(immunogen)在另一动物体内来诱导免疫反应,生产所谓的抗-抗-Id(anti-anti-Id)抗体。该抗－抗－Id在抗原表位上可能与诱发抗－Id的原初mAb相同。因此，利用抗mAb特异型决定簇的抗体，有可能来鉴定表达相同特异性抗体的其他克隆。

因而，抗本发明的ＩＣ－结合蛋白质、及其类似物或衍生物的mAbs，或者抗Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ、ＦＡＳ－ＤＤ、以及其类似物或衍生物的mAbs可用来在合适动物例如ＢＡＬＢ/Ｃ鼠体内诱导抗－Id抗体。这些被免疫鼠的脾脏细胞可用来生产抗－Id杂交瘤分泌的抗－Id mAbs。进一步，抗－Id mAbs能够连接于一载体如匙孔蝾血蓝素(Keyhole limpet hemocyanin, 缩写为KLH）和用于对补加的BALB/C鼠免疫。由这些鼠产生的血清将含有抗－抗－Id抗体，后者具有原初mAb的结合性能，而原初mAb对上述ＩＣ－结合蛋白质 、 其类似物或衍生物，或者Ｐ５５ＩＣ、

P55DD、FAS-IC或FAS-DD、及其类物或衍生物的抗原表位具有特异性。

抗-Id mAbs因而有它们本身的特异型抗原表位，或“独特位”(idiotopes)。它们在结构上类似于要评价的抗原表位，如GRB蛋白质-α。

术语“抗体”既包括完整的抗体分子又包括能结合抗原的片段，例如Fab和$F(ab')_2$，Fab和$F(ab')_2$片段，是缺少完整抗体中的FC片段，在循环中比完整的抗体能更快地纯净透明，以及具有较弱的非特异性组织结合力(non-specitic tissue binding) (Wahl 等 ,J.Nucl.Med.24:316-325(1983)。

值得一提的是按照此处披露的用于完整抗体分子的方法在本发明中使用的一些抗体的Fab和$F(ab')_2$及其它片段，可用于检测和定量分析IC-结合蛋白或者P55IC、P55DD、FAS-IC、或FAS-DD。这些抗体片段是用蛋白水解酶，例如番木瓜酶（papain）（生产Fab片段），或胃蛋白酶（pepsin）(生产$F(ab')_2$片段）水解蛋白而产生的典型产物。

如果，一个抗体能够与某分子进行特异反应，以此使其结合于抗体上，我们就说该抗体能够结合一个分子。术语(抗原)表位(epitope)意指能够被抗体结合、还能被抗体识别的任何分子的片段。表位(epitopes)或“抗原决定簇”，通常是指一些表面化学活性基团如氨基酸或糖侧链并且具有特殊三维结构以及特殊的电荷特性。

抗原是一个分子或一个分子的一部分，它能够被某一抗体结合并进一步能够诱导动物产生抗体，该抗体能够结合于相应抗原的抗原表位。一个抗原可有一或一个以上的抗原表位。上面提到的特异反应意思是，抗原以高度选择性方式与其相应的抗体反应，而不与被其它抗原引起的抗体起反应。

在本发明中所用的诸抗体，包括这些抗体的片段，可用于在一个样品中，定量或定性检测IC-结合蛋白或P55IC、P55DD、FAS-IC、FAS-DD，或者用于检测表达本发明的IC-结合蛋白或P55IC、P55DD、FAS-IC、FAS-DD蛋白的细胞的存

在。检测可通过免疫荧光术，即使用荧光标记抗体（见下述）结合以光学显微镜、流式细胞检测术（flow cytometric)、或荧光检测术等检测技术来完成。

用于本发明的一些抗体及其片段，可用来在组织学上，如在免疫荧光中或免疫电子显微检测术中，用原位检测法检测本发明的ＩＣ－结合蛋白或Ｐ５５ＩＣ－Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ、ＦＡＳ－ＤＤ。原位检测即通过从患者身上切取组织样品，然后加本发明的标记抗体来完成。加抗体（或其片段）的最佳方法，是将标记的抗体（或片段）附着于或叠加于组织样品上。借此，不仅可能测定ＩＣ－结合蛋白或Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ、ＦＡＳ－ＤＤ的存在，而且还可能测得它在被研究的组织上的分布。利用本发明，普通技术人员也可轻易地意识到，各种组织学方法中的任何一种（例如染色法）均可被修改来进行原位检测。

用于本发明的ＩＣ－结合蛋白或Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ、FAS－DD的测定法典型地包含，首先在能够鉴定ＩＣ－结合蛋白或Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＩＣ、ＦＡＳ－ＩＣ、ＦＡＳ－ＤＤ的可检测标记的抗体存在下，培养样品，如生物体液、组织提取物、新鲜采集的细胞如淋巴细胞或白细胞，或在组培中已培育好的细胞，然后用任何一种已知技术来检测抗体。

生物样品可用固相支持物或载体如硝化纤维素，或其他能够使细胞、细胞颗粒或可溶性蛋白固定下来的固体支持物或载体来进行处理。然后将这些支持物或载体用适合的缓冲液洗涤，随后用可检测的标记抗体处理，按照本发明，如上述。然后将固体支持物或载体用缓冲液进行第二次洗涤，以除去未结合上去的抗体。结合在固体支持物或载体上的标记物的量，可用普通方法检测之。

所说的“固相支持物”、“固相载体”、“固体支持物”、“固体载体”、“支持物”或“载体”，应延伸到任何一种能够结合抗原或抗体的支持物或载体。已知的支持物或载体，包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖 、尼隆 、淀粉酶 、天然的和修饰过的纤维素类、聚丙烯酰

胺、辉长岩、磁铁矿。载体的性质在某种程序上可以是可溶性的，也可以是不溶性的。支持材料，实际上可以是任何可能的结构构型，只要使连接的分子能够结合于抗原或抗体。因此，支持物或载体的构型可以是球形的如珠状的，或圆筒形的，例如放入试管的内面，或者放在条棒的外面。另一情况是，它们的表面可以是扁平的，例如片状的、试验条状的等。优选的支持物或载体是聚苯乙烯胶珠。对本技术熟悉的人员将知道其它许多适合的载体可用于结合抗体或抗原，或通过使用常规实验来确定同样的载体。

本发明上述给出的许多抗体的结合活性，可按照已知方法测定。对本技术领域熟悉的人，都能利用常规实验确定最适合的操作和测定条件。

其它操作步骤，诸如洗涤、搅拌、摇动、过滤等，可按照惯例酌情增减。

根据本发明，标记抗体的检测方法之一，是将抗体与酶相连接然后用于酶免疫测定法（EIA）中。这种酶，当与适当的酶作用物相接触时，便与这种酶作用物起反应而产生一种化学裂解物，该裂解物能够被检测出来，例如用分光光度法、荧光法或目视法测定之。能够用作标记抗体检测的酶类，包括，但不限于，苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、δ－5甾族化合物异构酶、酵母醇脱氢酶、α－甘油磷酸脱氢酶、丙糖磷酸异构酶、辣根(horseradish)过氧化物酶、碱性磷酸（酯）酶、天冬酰胺酶、半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡糖淀粉酶、乙酰胆碱酯酶。检测可用比色法，即对酶使用生色的酶作用底物。检测也可以通过可见性比较来完成，即将酶作用于底物的酶反应程度与相似制得的标准作比较。

检测也可见用任何一种其他免疫测定法进行。例如利用放射性标记的各种抗体和抗体片段,通过使用放射免疫测定法(radioimmunoassay,缩写为RIA）有可能检测RPTP酶(R-PTPase)。对RIA的一份较好的描述文献,可参见work,T.S.等人在《Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology》中的报道,North Holland Publishing company, NY(1978),具体参考Chard,T所著题为"An Introluction to Radioimmune Assay and Related Techniques"一章,本文已列入参考文献目录。利用r

计数器或闪烁计数器或以放射自显影，也能检测到放射同位素。

根据本发明，也可能用荧光化合物来标记抗体。当用荧光化合物标记的抗体曝露于适当波长的光照下时，由于荧光的产生便能检测到它的存在。最普遍使用的荧光标记化合物有荧光素异硫氰酸盐、若丹明、藻红蛋白、藻青蛋白、异源藻青蛋白（allophycocyanin)、邻－苯二醛及荧光胺。

利用荧光放射性金属如１５２Ｅ或其它镧系元素，也能使抗体作成可检测的标记物。利用这些金属的螯合基团如二亚乙基三胺五乙酸（diethylenetriaminepentaacetic acid,ETPA),便能将这些金属连接于抗体。

通过连接抗体于化学发光化合物，也能将抗体制成可检测的标记物。通过检测化学反应过程中所产生的亮光，便能测得化学发光物－标记的抗体。特别有用的化学发光标记化合物，有鲁米诺、异鲁米诺、吖啶鎓酯(theromatic acridinium ester)、咪唑、吖啶鎓盐以及草酸酯。

同样，生物发光化合物，也可用来标记本发明的抗体。生物发光是出现于生物系统中的一类化学发光现象，其中一种催化蛋白质能增加化学发光的效率。生物发光蛋白质的存在，可通过检测亮光的出现而测得。用于标记目的的重要生物发光化合物，有荧光素、荧光素酶、水母发光蛋白(aequorin)。

本发明的抗体分子可适用于免疫量测定，也叫做"二-位"(two-site)或“夹层”（sandwich）测定。在典型的免疫量测定中，将一定量的未标记可溶性抗体（或抗体片段）结合于固体支持物或载体，加入一定量的可检测的可溶性标记抗体，使有可能检测和/或定量测定在固相抗体，抗原，与标记了的抗体之间所形成的三元复合物(ternary complex)。

典型的和优选的免疫量测定法包括“正向”(forward)测定法，在其中将已结合于固相上的抗体首先与欲测试的样品接触，以便通过形成二元(binary）固相抗体－抗原复合物，从样品中提取抗原。经过适当的培养之后，将固体支持物或载体进行洗涤以除去流体样品的残留物，包括未反应的抗原（如果有的话），并与含有未知量的标记抗体（其作用为一种“报

告分子”）溶液接触。在第二次培养期之后，让标记抗体通过未标记的抗体与结合于固体支持物或载体上的抗原进行复合(complex)，然后将固体支持体或载体进行第二次洗涤以除去未反应的标记抗体。

在另一类“夹层”测定法中，使用了所谓的“同时(simultaneous)”测定法和“反向”(reverse)测定法，“夹层”测定法与本发明的抗原都是有用的。当结合于固体支持物或固体载体的抗体与标记抗体同时加入到待测试样品中时，“同时测定法”含有一单独培养步骤，在培养完成后，将固体支持物或载体进行洗涤以除去流体样品的残留物和未发生复合作用的标记抗体。然后，按照普通“正向”夹层测定法测定与固体支持物或载体缔合的标记抗体。

在“反向”(reverse)测定法中，是采用逐步添加法，首先将标记抗体加入到流体样品中，在适当的培养期之后加入结合于固体支持物或载体上的未标记的抗体。在第二次培养之后，将固相以普通方式洗涤以除去欲测样品的残留物和未反应的标记抗体。然后用“同时”测定法和“正向”测定法测定与固体支持物或载体相缔合的标记抗体.

本发明的新型蛋白质，一旦用任何一种常规筛选方法，例如酵母双－杂种法、亲合色谱法以及任何已知技术分离、鉴定和表征之后，便可以用常规重组ＤＮＡ技术大量生产（例如参见Sambrook等，１９８９），即利用适当的真核或原核载体（含有对蛋白质编码的序列）转化适当的真核或原核宿主的细胞。因而，本发明还涉及用于生产本发明的一些蛋白的这样一些表达载体和转化了的宿主细胞。如上所述，这些蛋白质还包括它们具有生物活性的类似物和衍生物，以及具有相应编码序列的载体和用于生产这些类似物的转化了的宿主细胞，这些蛋白质的衍生物，是指用常规修饰法对转化后的宿主细胞所生产的蛋白质或其类似物进行修饰所产生的产物。

另一方面，本发明还述及使用Ｐ５５ＴＮＦ－Ｒ的胞内区（Ｐ５５ＩＣ）或ＦＡＳ－Ｒ的胞内区（ＦＡＳ－ＩＣ）或它们的所谓“死亡功能域”（分别为Ｐ５５ＤＤ或ＦＡＳ－ＤＤ）作为增强剂（agent for enhancing）来增强ＴＮＦ或ＦＡＳ－Ｒ配基对细胞的作用，和对其本

身的作用（见实施例２）。当某处需要引入ＴＮＦ诱发的或ＦＡＳ－Ｒ配基诱发的细胞毒性作用时，例如癌细胞内或ＨＩＶ－感染细胞内，利用上述（见上述（ｉ））重组动物病毒（例如牛痘）途径便能将Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ或ＦＡＳ－ＤＤ引入这些细胞中。此处也可使用天然的Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ或ＦＡＳ－ＤＤ，及其具有生物活性的类似物和衍生物或片段，所有这些物质可按上述方法制备。

同样，本发明还涉及对ＴＮＦ效应或ＦＡＳ－Ｒ配基效应的特异性封阻(specific blocking)作用，即封阻Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ或ＦＡＳ－ＤＤ的活性，例如一些反义寡核苷酸序列可引入这些细胞中来封阻Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ或ＦＡＳ－ＤＤ的表达。

本发明还涉及一些药物组合物，它们包含一些编码ＴＮＦ－Ｒ或ＦＡＳ－Ｒ胞内区结合蛋白（包括Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ及ＦＡＳ－ＤＤ）重组动物病毒载体，这些载体还编码能够结合特定靶细胞（例如癌细胞）表面蛋白而引导胞内区结合蛋白序列嵌入某些细胞中的病毒表面蛋白。

在另一方面，本发明还详细地述及Ｐ５５ＴＮＦ受体的胞内区（Ｐ５５ＩＣ，见实例２）自身缔合作用的效应。例如编码ＩＬ－８基因的表达，这种效应通常是以ＴＮＦ结合于它的受体介导的结果，并且也可以被Ｐ５５－ＩＣ或其片段自缔合所产生的信号活性所模仿。

ＩＬ－８是一种细胞激动素(cytokine)，它属于化学激动素(chemokines)亚类，具有基本的趋化活性(chemotactic activity)并已证明在颗粒细胞以及与许多病理状态相关的细胞的趋化性(chemotaxis of granulocytes)中起着重要作用（参见例如Endo等，１９９４；Sekido等，１９９３；Harada等，１９９３；Ferrick等，１９９１）。

ＴＮＦ具有有益的活性，如可用作治疗来消灭肿瘤细胞和病毒感染细胞或者用于增加颗粒细胞的抗菌活性。但是，如上述，ＴＮＦ还有不理想的活性，在此情况下希望封阻这些活性，包括使用大剂量ＴＮＦ用于癌症

治疗、抗病毒治疗或抗菌治疗等情况下。

因此，希望可能引导ＴＮＦ或模拟其有益活性的物质到需要处理的细胞或组织中，这对治疗是特别有益的。

根据本发明，现已发现Ｐ５５－Ｒ的自－缔合胞内区（Ｐ５５－ＩＣ）能够以不依赖于配基的方式，模拟ＴＮＦ的许多效应，例如Ｐ５５－ＩＣ的“死亡功能域”能够诱发杀细胞效应，以及Ｐ５５－ＩＣ能够诱导ＩＬ－８基因表达。因而，有可能利用Ｐ５５－ＩＣ以点定位方式来模拟ＴＮＦ功能，亦即诱导Ｐ５５－ＩＣ仅对需要治疗的细胞或组织起作用。

上述途径之一，如上所述，是用编码Ｐ５５－ＩＣ的ＤＮＡ分子或其一部分特异性转染肿瘤细胞或恶性组织，它们不仅能够诱导对这些细胞或组织杀细胞效应，而且还能通过与ＩＬ－８的共－诱导作用(co-induction）增强这些效应，结果导致在这种细胞或组织上积蓄了颗粒细胞和其他淋巴细胞，它们将依次用来杀死肿瘤细胞或组织。这种途径可消除大剂量使用ＴＮＦ所伴有效杀害的副作用。

利用常规重组ＤＮＡ技术，有可能制备Ｐ５５－ＩＣ的各种区段(regions)，并确定到底哪一个区段对每一ＴＮＦ－诱发的效应有关，例如我们已经测得“死亡功能域”与细胞毒性有关（实例２），且已经制备了各种其它含有部分Ｐ５５－ＩＣ的构建体，这些部分（与部分或全部死亡功能域一起）是引起其他ＴＮＦ－效应的重要原因，并且它们可以不依赖配基的方式被使用，一旦发生自缔合作用，将诱发这些效应，例如ＩＬ－８的表达诱导。

应当指出，与其它ＴＮＦ相关效应诱导有关的Ｐ５５－ＩＣ的序列不同于与细胞毒诱导有关的Ｐ５５－ＩＣ的序列，亦即可能不包括或包括部分“死亡功能域”并具有来自胞内区的其它区段的序列基元(motits)，或者也可能为相同的序列，该序列(相同序列基元)的不同特征是涉及不同效应的诱导。

因而，正如上下文所详述，含有Ｐ５５－ＩＣ片段、其类似物或衍生物的表达载体可以得到被制备 、表达、纯化以及对其活性进行测试。 这

样，可以制备具有一个或多个ＴＮＦ－相关活性的多种Ｐ５５－ＩＣ片段和以不同方式用于治疗多种疾病，例如病毒感染、细菌感染、肿瘤等。在所有这些情况中，比活性的增加可通过与Ｐ５５－ＩＣ片段结合（或共－转染）实现，Ｐ５５－ＩＣ片段是诱导ＩＬ-８基因表达的主要原因，ＩＬ－８的趋化活性可以用来增强对需要杀灭的细胞或组织的破坏作用。

这样，无需系统地施用ＴＮＦ，通过引入全部或部分Ｐ５５－ＩＣ到需要治疗的细胞或组织中便有可能诱发它的有益效应。

通过上述任何方法之一，Ｐ５５－ＩＣ均可特异地被引入希望杀灭细胞或组织中。例如一种方法是通过构建重组动物病毒，例如来自牛痘的一种病毒，向其ＤＮＡ中可引入以下两种基因：一种基因编码的配基能专一性结合于细胞表面蛋白，例如能特异性结合于某些细胞（CD_4 淋巴细胞和有关白血病）的AIDS病毒gp120蛋白，或者编码能够特异性结合于载有ＴＮＦ－Ｒ的细胞的配基，这样的重组病毒载体将能够结合一些携载ＴＮＦ－Ｒ的细胞；另一基因编码Ｐ５５－ＩＣ或其片段。这样以来，在病毒表面上的细胞表面结合蛋白的表达，将使病毒瞄准攻击肿瘤细胞或其它携载ＴＮＦ－Ｒ的细胞，随后Ｐ５５－ＩＣ或其一部分的编码序列，将被通过病毒而引入这些细胞。并且，一旦在这些细胞中被表达便会增强 ＴＮＦ效应而导致肿瘤细胞或其它载有ＴＮＦ－Ｒ细胞的死亡，或者诱导ＩＬ－８而导致这些细胞死亡。构建这种重组动物病毒，可用常规操作技术（参见例如Sambrook等，１９８９）。另一种可能性是以寡核苷酸形式将Ｐ５５－ＩＣ序列或其部分引入细胞，该寡核苷酸能够被细胞接纳并表达于其中。

因而本发明还具体涉及一些药物组合物，包含有编码Ｐ５５－ＩＣ或其一部分的上述重组动物病毒载体该载体也编码病毒表面蛋白，该蛋白能够结合特异的靶细胞（例如癌细胞）表面蛋白而引导Ｐ５５－ＩＣ，或其片段的编码序列嵌入这些细胞。

本发明还在另一方面涉及一些新型合成的ＴＮＦ受体，它是可溶性的并能形成二聚体，还可能形成更高级多聚ＴＮＦ受体分子，这些受体的每一单体部分都能结合于一个ＴＮＦ单体。自然产生的ＴＮＦ为一种同源三

聚体，含有三个活性ＴＮＦ单体，每个都能结合于一个ＴＮＦ受体分子，而自然产生的一些ＴＮＦ受体均为单体，每个都仅能结合ＴＮＦ同源三聚体分子中的一个单体。因而，当ＴＮＦ结合于细胞表面上的一些ＴＮＦ受体时，便能结合于三个受体分子，结果便形成一簇ＴＮＦ受体，这被认为是信号产生过程的开始，此过程最终引发所观察到的ＴＮＦ效应。

一方面ＴＮＦ具有许多有益效应，例如它能够杀灭肿瘤细胞或病毒感染细胞以及增加颗粒细胞的抗菌活性，然而ＴＮＦ还具有许多不利效应，例如在许多严重的疾病中包括自身免疫病、类风湿关节炎、移植体－对抗－宿主反应（移植排异反应）、败血病休克等，ＴＮＦ被认为是病理组织损坏的主要原因。ＴＮＦ还会引起严重消瘦（恶病体质Cachexia），这是由于抑制了脂肪细胞的活性。而且，即使是按照其需要活性而施用时，例如在治疗各种恶性的或病毒性疾病情况下，所用的ＴＮＦ剂量常常足够高，以致在患者体内引起许多不利的细胞毒性副作用，例如对健康组织的损坏。

在所有上述情况下，ＴＮＦ的作用是不利的，因此曾经寻求对ＴＮＦ的有效抑制剂。许多ＴＮＦ－封阻剂(TNF-blocking agents）已被提出，包括一些可溶性的蛋白质，它们能够结合ＴＮＦ，抑制ＴＮＦ结合于它的受体，从而抑制ＴＮＦ的细胞毒效应（见EP308378,EP398327及EP568925)。然而，这些ＴＮＦ结合蛋白，或可溶性ＴＮＦ受体，都是单体，每个只能结合ＴＮＦ同源三聚体中的一个单体。因而，ＴＮＦ功能的封阻可能不完全，每个单体受体体结合后的ＴＮＦ分子，仍然具有两个ＴＮＦ单体处于游离状态，还能结合细胞表面ＴＮＦ受体，对细胞产生不利的副作用。

为了克服封阻ＴＮＦ功能时的上述缺点，本发明已发展了一方法用于构建一些可溶性寡聚ＴＮＦ受体，即一些融合蛋白质，它们能够结合自然产生的ＴＮＦ同源三聚体分子中的至少两个ＴＮＦ单体。结果，这些可溶性寡聚ＴＮＦ受体，比以前所知的单体可溶性ＴＮＦ结合蛋白或受体，便能更加强烈地结合于它们的ＴＮＦ配基。例如，当本发明的可溶性ＴＮＦ受体是处于二聚体形式时，便有可能结合ＴＮＦ三聚体的两个单体，因而

引起更加完全的ＴＮＦ中和作用．由于可溶二聚受体从ＴＮＦ中的解离速率较低，因此这种中和作用是较持久的．而且，这种可溶性寡聚受体，与它们的单体对应部分相比，分子量较大，这在药物学上也有优点，因为它们从人体内的清除时，很可能具有较慢的速度。

本发明可溶性寡聚ＴＮＦ受体的发展是基于如下发现：Ｐ５５－Ｒ ＴＮＦ受体的胞内区能够自缔合，并进一步发现在这种胞内区（Ｐ５５－ＩＣ）中存在一个区段，叫做“死亡功能域”(death domain)，它也能自缔合并能以不依赖于配基的方式产生细胞毒性效应（见实施例２）。利用Ｐ５５－ＩＣ及其“死亡功能域”的这种自缔合性能，通过常规重组ＤＮＡ技术，便有可能构建一种融合蛋白质，使其含有ＴＮＦ受体的全部胞外区，例如Ｐ７５－Ｒ或Ｐ５５－Ｒ的一些受体，最好是Ｐ５５－Ｒ，并融合于全部胞内区（Ｐ５５－ＩＣ）或Ｐ５５－ＩＣ的死亡功能域。这样便能生产一种新型融合产物，它的一端具有ＴＮＦ结合区，即受体的胞外区，另一端具有胞内区或其死亡功能域，并能发生自缔合。因此，通过两个（和可能两个以上）Ｐ５５－ＩＣ或其死亡功能域间的自缔合作用而发生聚合，从而得到一些同时具有至少两个ＴＮＦ结合区的寡聚物（或者至少为二聚体）。

进一步，根据本发明，还曾经发现，Fas/APO1受体也具有自缔合作用，它的胞内区含有自缔合“死亡功能域”，并与Ｐ５５－ＩＣ及其死亡功能域有某些同源性(homology)（实施例２）。因而通过融合ＴＮＦ受体的胞外区（如上所述)与Fas/APO1受体的胞内区或“死亡功能域”，有可能构建出本发明的一些可溶性寡聚ＴＮＦ受体。

在上述两种情况下，本发明的寡聚ＴＮＦ受体，都是可溶性的，实际上仅具有ＴＮＦ受体的可溶性胞外区和Ｐ５５－ＲＴＮＦ受体或Fas/APO1受体二者的可溶性胞内区或其“死亡功能域”，亦即它们不含有两种类型受体的横跨膜(transmembranal)区或不溶性区域。

本发明上述寡聚ＴＮＦ受体的构建，详述于下面的实施例４。尚需指出，构建本发明的寡聚ＴＮＦ受体时，还会产生一种情况，这种情况在此之前尚无报道，即ＴＮＦ受体的胞外区能自缔合，这种情况可能是不利

的，因这会干扰低寡聚受体结合于同源三聚体分子的两个以上的ＴＮＦ单体，或者会导致与ＴＮＦ单体结合能力减弱。因而，在这种情况下，有可能利用常规重组ＤＮＡ技术来修饰ＴＮＦ受体的胞外区，例如通过删除或取代自缔合区段中的一个或多个氨基酸残基，以防止这样的自缔合现象。ＴＮＦ的胞外区的这种修饰，也是本发明的部分内容，且被命名为ＴＮＦ受体的胞外区的类似物或衍生物。同样，Ｐ５５－Ｒ受体或Fas/APO1受体的自缔合胞内区（ＩＣ）或其死亡功能域（ＤＤ），已用于本发明的寡聚ＴＮＦ受体中，它们也可以是其类似物或衍生物，亦即可以是对Ｐ５５－ＩＣ序列或其包括死亡功能域（Ｐ５５ＤＤ）的片段的修饰产物或者对Fas/APO1胞内区（ＦＡＳ－ＩＣ）序列或其包括死亡功能域（ＦＡＳＤＤ）的片段的修饰产物，如果这些修饰可获得一种自缔合产物的话。

同样，可溶性寡聚ＴＮＦ受体、其类似物或衍生物，一旦生产出来并经过纯化，便可利用常规化学方法作进一步的修饰以提供它们的盐类和功能衍生物，用于制备一些药物组合物，这些药物组合物都含有本发明的ＴＮＦ受体作为活性成分。

为了生产本发明的可溶性寡聚ＴＮＦ受体，编码ＴＮＦ受体胞外区的ＤＮＡ序列，是得自所有ＴＮＦ受体的已有克隆，同样还得到其胞内区或死亡功能域的ＤＮＡ编码序列，以及Fas/APO1受体的胞内区或死亡功能域的ＤＮＡ编码序列（见实施例２和实施例５）。用这样的方法，所需胞外区的ＤＮＡ编码序列可连接于所需胞内区或其包括死亡功能域的片段的ＤＮＡ编码序列，这种融合产物在启动子(promoter)和其它表达调控序列的调控下，被嵌入（和连接于）一适当表达载体中。一旦形成，表达载体便被引入（转化、转染等）到适当的宿主细胞中，然后表达载体，而得到本发明的融合产物，即一些可溶性的自－缔合ＴＮＦ受体分子。然后利用常规操作将这些分子从宿主细胞中纯化出来，而产生最终产物，即一些可溶性的寡聚ＴＮＦ受体。

编码胞外区和胞内区或其一部分的融合产物的较好制备方法，是按照ＰＣＲ技术路线，利用对所需序列特异的寡核苷酸做探针。从编码所有ＴＮＦ受体分子的克隆中复制所需序列。另一种方法也是可能的，例如由

限制性核酸内切酶分离编码胞外区和胞内区的所需部分，然后按已知方式将它们并接在一起，在酶切片段末端上进行修饰或不修饰，以保证受体的需要部分（胞外和胞内区或其一些部分）的正确融合。然后将这样得到的融合产物嵌插入所选的表达载体中。

以同样方式，本发明还涉及一些可溶性寡聚Fas/APO1（ＦＡＳ）受体，它们含有Fas/APO1受体的胞外区和Ｐ５５－Ｒ的自－缔合胞内区（Ｐ５５－ＩＣ）及其死亡功能域（Ｐ５５ＤＤ），或者Fas/APO1受体的自－缔合胞内区（ＦＡＳ－ＩＣ）或其死亡功能域（ＦＡＳ ＤＤ），或它们的任何类似物或衍生物（见上述）。这些可溶性寡聚ＦＡＳ受体的构建，详述于下面的实施例5中，即用ＦＡＳ受体－编码序列全长作为初始材料，适当的寡聚物引物用于所需胞外和胞内区编码序列的ＰＣＲ扩增，然后将它们连接起来而得到融合产物，将该产物嵌插入适当的表达载体中。

正如上下文的详述，原核或真核生物细胞载体及宿主细胞可用来生产所需要的可溶性寡聚ＦＡＳ受体，然后将这些受体纯化和作为活性成分配入药物组合物中。

本发明的上述可溶性寡聚ＦＡＳ受体，拟用于有效地封阻Fas的配基，该配基还会以三聚体存在（类似于ＴＮＦ，见上述），本发明的每一寡聚受体均能结合两个或可能更多的Fas配基，并以此中和它们的活性。Fas配基已知主要是与细胞－表面缔合的，但还会以可溶形式存在。不论怎样，本发明的寡聚ＦＡＳ受体能够结合于这种配基的至少两种单体并以此更有效地（比之单体ＦＡＳ受体）中和Fas配基的活性。Fas配基，和ＦＡＳ受体的活化，牵涉到许多疾病，特别是有关肝损伤的疾病（例如肝细胞的编程性细胞死亡(apoptosis)，包括与肝炎有关的肝损伤，以及自身免疫症状，包括在 ＨＩＶ感染人体中的淋巴细胞损伤（编程性细胞死亡）（例如见Ogasawara等，１９９３；Cheng等，１９９４）。因此本发明的可溶性寡聚ＦＡＳ受体，拟用于封闭Fas配基活性，并可用作药物组合物的活性成分，用来治疗例如与Fas配基有关的疾病。

同样，本发明还涉及一些可溶性的寡聚受体，它们对ＴＮＦ和ＦＡＳ－Ｒ配基具有亲合性，这些寡聚受体就是所谓的“混合”TNF-R/FAS-R寡

聚物受体。这些寡聚物受体含有至少一个ＴＮＦ－Ｒ胞外区和至少一个ＦＡＳ－Ｒ胞外区，它们能借助于每个胞外区在寡聚受体中与上述的自－缔合的Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳＩＣ或ＦＡＳＤＤ之一融合而相互结合起来。

这些混合寡聚物受体可按如下方法制备：（ａ）提供任何上述融合产物，它们含有TNF-Ｒ的胞外区（Ｐ７５ＴＮＦ－Ｒ，或最好为Ｐ５５ＴＮＦ－Ｒ）融合于任何一个自－缔合胞内区Ｐ５５ＩＣ和ＦＡＳＩＣ或任何一个自－缔合“死亡功能域”Ｐ５５ＤＤ和ＦＡＳＤＤ，或任何自－缔合片段、任何它们的类似物或衍生物，（ｂ）提供任何上述融合产物，它们含有ＦＡＳ－Ｒ的胞外区并融合于任何一个自－缔合Ｐ５５ＩＣ、ＦＡＳ－ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ及ＦＡＳＤＤ，或者任何自－缔合片段或它们的任何类似物或衍生物，及（ｃ）将（ａ）中的任何ＴＮＦ－特异性融合产物与（ｂ）中的任何ＦＡＳ－Ｒ配基-特异性融合产物进行混合，以提供（在常规分离和纯化方法之后）寡聚（二聚体或更高级的多聚体）受体，它们至少具有ＴＮＦ－Ｒ和ＦＡＳ－Ｒ二者的胞外区，借助于它们融合的ＩＣ或ＤＤ区段的自－缔合作用而相互结合。

用于制备上述混合寡聚受体的另一种可能性，是将适当的宿主细胞用上述表达载体进行共转化（co-transforming），表达载体之一编码ＴＮＦ－特异性的ＴＮＦ－融合产物，另一个编码为ＦＡＳ－Ｒ配基－特异性的ＦＡＳ－Ｒ融合产物。随着这些不同融合产物在宿主细胞中的表达，混合寡聚（ＴＮＦ－Ｒ/ＦＡＳ－Ｒ）受体利用常规纯化和分离技术而制得。

这些混合亲合性寡聚受体的用途主要是用来中和ＴＮＦ和ＦＡＳ－Ｒ配基，尤其当这二者发生内生过量表达或在外源施用之后达到过高水平时使用。最近证据指出一种可能性，认为在ＦＡＳ－Ｒ配基（通常是与细胞表面结合）与ＴＮＦ－α（它也可能是与细胞表面结合）之间在功能上存在协同作用。因而，在某些情况下，需在细胞表面的相同点上同时中和两种配基，亦即需要这样一种既能够阻止ＴＮＦ结合于它的受体，又能阻止ＦＡＳ－Ｒ配基结合于它的受体的混合亲合受体。

因此，这些混合亲合受体，在药物组合物中，可用作一种活性成分，用于

治疗上述症状（见上述），即ＴＮＦ和ＦＡＳ－Ｒ配基效应是不利的情况。

同样，基于本发明可溶性寡聚ＴＮＦ－Ｒ和ＦＡＳ－Ｒ以及混合ＴＮＦ－Ｒ/ＦＡＳ－Ｒ寡聚物的系列，有可能生产一些用于其它受体的可溶性寡聚受体，或者它们的混合物，特别是ＴＮＦ/ＮＧＦ超家族的任何其它成员的受体。在此情况下，各种受体的任何胞外区都能融合于上述自－缔合胞内区或其某些区段，或者融合于能自－缔合的超家族成员的任何其它胞内区。

上述本发明任何重组蛋白质，都能通过适当的表达载体而在真核生物细胞（例如酵母、昆虫或哺乳动物细胞）中表达。任何有关已知的技术都可使用。

例如，将用上述任何方法所得的编码蛋白质的ＤＮＡ分子，利用本领域已知技术插入合适的表达载体中（见Sambrook等，１９８９）。通过同聚物的尾部（tailing），或者通过使用合成ＤＮＡ连接酶或钝末端连接技术（blunt-ended ligation）进行限制连接，可将双链cＤＮＡ连接于质粒载体（plasmid vectors)中。ＤＮＡ连接酶是用来连接ＤＮＡ分子并且要通过使用碱性磷酸（酯）酶处理而避免不需要的连接。

为了能够表达需要的蛋白质，表达载体还应包括一些特异的核苷酸序列，后者包含有对所需蛋白质具转录和翻译调控信息的ＤＮＡ序列，使许多基因得以表达。首先，为使基因得以转录，被ＲＮＡ聚合酶识别的启动子(promoters)必须开始活动，接着聚合酶结合于该启动子并启动转录。有许多这样的启动子在使用，它们的启动效率不同（强的或弱的启动子）。原核生物细胞和真核生物细胞的启动子也是不同的。

能够用于本发明的一些启动子既可以是组成型的，例如噬菌体（bacteriophage）的int启动子、ＰＢＲ３２２的β内酰胺酶的bla启动子以及ＰＰＲ３２５的氯霉素乙酰基转移酶基因的ＣＡＴ启动子等；又可以是诱导型的(inducible)，例如原核生物细胞启动子，包括噬菌体 的主要右和左启动子（ＰＬ和ＰＲ）、trp、recA、lacZ、lacL、ompE以及大肠杆菌gal启动子，或者trp-lac混杂启动子等（Glick,B.R.(1987)）。除使用

强启动子来产生大量mRNA外，为了达到在原核生物细胞中高水平的基因表达还需使用核糖体－结合区以确保mRNA被有效地转译。一例是从起始编码子（codon）适当定位的和与16S RNA 3′－末端序列互补性的Shine-Dalgarno序列（SD序列）。

对于真核生物宿主细胞，可根据宿主的性质而使用不同的转录和转译调控序列。它们可以来自病毒源，例如腺病毒、牛乳头瘤病毒、猿猴病毒等，其中调节信号与高水平（high level)表达的基因有关联。例如疱疹病毒的TK启动子，SV40早期启动子，酵母gal 4基因启动子等。考虑到转录始起调节信号抑制或激活作用，需要对其进行选择以便能对基因的表达进行调控。

包含有编码本发明的融合产物蛋白质的核苷酸序列的DNA分子，被插入具有可进行连接操作的转录和转译调节信号的载体中，这些信号能够整合所需的一些基因序列进入宿主细胞中。由引入的DNA稳定转化的细胞，可通过引入一个或多个标记基因（markers)而加以选择。标记基因可对营养缺陷型的宿主提供营养、或对杀生剂的抵抗力(biocide resistance)，例如对抗生素，或重金属如铜等的抗性。可选择的标记基因，既能被直接连接于要表达的DNA序列，也可通过共－转染(co transfection)而引入同一细胞。为了最佳地合成本发明的蛋白质，还需一些附加要素。这些要素可包括转录启动子，增强子(enhancer)子。具这些要素的cDNA表达载体，包括Okayama,H(1983)所述及的载体。

在一优选实施例中，引入的DNA分子将整合进入一个质粒或病毒载体中，该质粒或病毒载体能够在受体细胞中自立地复制。选择特定质粒或病毒载体的重要因素包括：容易性,即含载体的受体细胞容易被识别并从不含载体的受体细胞分离出来；在特殊宿主中所需要的多拷贝数以其是否能在不同种宿主细胞间“转移”。

优选的原核生物细胞载体，包括这样一些质粒，如能在大肠杆菌体内复制的质粒，例如PBR322,COLE1,PSC101,PACYC184等（见Maniatis等,1982;Sambrook等,1989)；杆菌(Bacillus)质粒如PC194,PC221,PT127等(Gryczan,T.(1982))；链霉菌属质粒,包括PLI101(Kendall,K.J.等,(1987))；

链霉菌属噬菌体，如φC31(Chater,K.F.等，in:Sixth International sympposium on Actinomycetales Biology(1986))，以及假单孢菌属质粒(John,J.F.等,(1986)and Izald, K.(1978))。优选的真核生物细胞质粒包括BPY，牛痘，SV40，2微米环状物(2-micron circle)等，或者它们的衍生物。这些质粒在本技术领域是已知的(Botstein, D.等，(1982);Broach, J.R.in: The Molecular Biology ofthe Yeast Saccharomyces: Life cycle and Inheritance (1981); Broach, J.R.(1982); Bollon, D.P.等,(1980);Maniatis, T.,in: Cell Biology: A Comprehensive Treatise vol.3, Gene Expression, (1980); 及Sambrook等,(1989))。

一旦载体或含构建体的DNA序列用于表达，则DNA构建体便可引人适当的宿主细胞中，用任何一种适当的方法：转化、转染、接合、原生质体(protoplast)融合、电击法(electroporation)、磷酸钙沉淀法、直接微量注射等。

用于本发明的宿主细胞可以是原核生物细胞，也可以真核生物细胞。优选的原核生物宿主包括细菌类，例如大肠杆菌、杆菌属、链霉菌属、假单孢菌属、鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)、粘质沙雷氏菌属(Serratia marcescens)等。最优选的原核生物宿主是大肠杆菌。具有特殊作用的细菌宿主包括大肠杆菌K12菌株294(ATCC3146)，大肠杆菌x1776(ATCC31537)，大肠杆菌W3110(F^-，$lambda^-$，质子移变(prototropic)(ATCC27325))，以及其它肠杆菌如鼠伤寒沙门氏菌或粘质沙雷氏菌以及各种假单孢种类。在这些条件下，蛋白质不需要糖基化的。原核生物宿主必需能与复制子(replicon)和表达质粒中的调控序列相匹配。

优选的真核生物宿主为哺乳动物细胞,例如人、猴子、老鼠以及中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary，缩写为CHO)等的细胞，因为它们能对蛋白质进行转译后修饰，包括在正确部位折叠(tolding)或糖基化用。酵母细胞也能进行转译后修饰，包括糖基化作用。已有多种重组DNA策略，是利用强启动子序列和质粒的高复制数，后者能够用于在酵母中生产所需要的蛋白质。酵母能识别克隆的哺乳动物基因产物上的一些主导序列

并分泌出含有主导序列的肽类（亦即前－肽类，pre-peptides）。

在引入载体后，宿主细胞在选择培养基中生长，该培养基可用于选择含载体的细胞。克隆的基因序列的表达，导致了所需要蛋白质的生产。

重组蛋白质的纯化，可按照用于此目的的多种已知方法中的任何一种进行，亦即任何常规操作技术，包括提取，沉淀，色谱法，电泳法等。纯化本发明蛋白质的另一理想操作技术，是使用抗－ＴＮＦ受体的单克隆抗体的亲合色谱法，单克隆抗体生产和固定在含于色谱柱内的凝胶基质中。含有重组蛋白质的不纯制备物通过色谱柱流出。蛋白质由特定抗体结合于柱上，而杂质通过柱子除去。在冲洗之后，蛋白质由于ＰＨ变化或离子强度变化而从凝胶上洗脱下来。

这里所使用的（见上述）术语“盐类”（Salts）是指羧基盐和由已知方法形成的蛋白质的氨基酸的酸添加盐。羧基盐，包括无机盐如钠、钙、及与有机碱形成的盐，例如与胺类，象三乙醇胺，精氨酸或赖氨酸形成的盐，酸添加盐包括，例如无机酸盐和有机酸盐。

这儿所用的“功能衍生物”包括了从功能团中制备出的衍生物，这些功能团是通过本领域的已知技术，是作为氨基酸残基上的侧链，或N-末端基或C-末端群基上的侧链而存在，并且只要它们保持了药用的可接受性，即，它们不损伤蛋白活性且不向包含药物的组分授予毒性，它们将都包含于本发明中，这些衍生物包括脂肪酸酯类或酰胺类，及自由氨基与酰基片段(例如链烷酰基或碳环芳酰基)形成的N-酰衍生物或自由羟基类与酰基片段形成的O-酰衍生物。

这儿所用的“部分”指受体的任何片段或部分，(其胞内区或胞外区)，或与受体胞内区结合的蛋白的一部分，如果该受体能保持它的生物活性的活。

如上所述，本发明涉及到各种药用组合物，这些药用组合物包括药用上可接受的载体，以及本发明所提到的各种活性成分，或其盐类，功能衍生物或上述物质的混合物。这些组分可用于这儿所提到的任何情况，例如，内源TNF 过量合成的情况,象败血休克症、恶病质、移植体对宿主的反应自动免疫病，象类风湿关节炎等。药物施用方式可以通过已被接受的任

何相似药剂的施用方式，并且也取决于要处理的情况，例如， 当被用来抑制TNF效应时，在败血休克症病例中，它们用作静脉内处理，或在风湿性关节炎中可用作局部注射(例如向膝盖内)，或连续输液等。 这些组合物也可用于如由体外施用过量TNF引起的TNF中毒病例中，象在癌症治疗或病毒病治疗病例中。

作为药物施用时，本发明的药用组合物通过蛋白或其衍生物与药用上可接受的载体、安定剂和赋形剂混合制备而成，并制备成剂量形式，如以干冻形式贮于瓶中。活性化合物的施用量取决于施用过程，治疗的疾病及病人的情况。例如，风湿性关节炎发炎情况下，基本体重的活性化合物局部注射用量将要比败血休克症病例中的静脉输液用量要少。

下述实例中将更明显地体现本发明的其它方面。

下面的非限制实例及其附图将更详细地说明本发明:

实例1

克隆和分离与ρ55和ρ75 TNF 受体胞内区结合的蛋白质。

为了分离与ρ55和ρ75 TNF 受体胞内区(ρ55 IC 和ρ75 IC)相互作用的蛋白质，使用了酵母双杂种体系(Fields and Song, 1989)。简单地说， 该双杂种体系是基于酵母的遗传试验，通过复原其真核细胞转录激活因子(activator)，如GAL4来检测特异性的蛋白质一蛋白质的体内相互作用。该真核细胞转录激活因子，例如GAL 4，有二个分开的区域: 即DNA结合区和激活区，这些区域，当表达时和结合在一起形成复原GAL 4 蛋白时，便能与上游的激活序列相结合，接着激活起动子、调控报告基因的表达，如LacZ或HIS3 报告基因的表达，它们的表达很容易在培养细胞中观察到。在此体系中相互作用的候选蛋白质的偏码基因被克隆进入独立的表达载体中。在一个表达载体中，一候选蛋白质偏码序列连同GAL4 DNA-结合区域的序列被同期克隆以产生带有GAL4 DNA-结合域杂种蛋白质; 在另一载体中，第二候选蛋白质的偏码序列与GAL4激活区域的偏码序列被同期克隆，以产生带有GAL4 -激活区的杂种蛋白。将二个杂种载体共转化到含有lacZ或HIS3 报告基因的酵母宿主细胞系中。该报告基因受上游GAL4 结合

位点的调控。 只有那些表达彼此相互作用的两种杂种蛋白的转化宿重细胞(共转化体)能够表达报告基因。在lacZ报告基因存在的情形下，表达此基因的宿主细胞将变为兰色的当X-gal加入培养物中时。因而，兰色克隆表示了二种克隆的候选蛋白质能够彼此相互作用的事实。

使用此双杂种体系，将胞内区在ρ55 IC 和ρ75IC 分别克隆进入载体ρGBT9 (携带GAL4 DNA-结合序列，由美国CLONTECH提供，见下文所述)中，产生带有GAL4 DNA-结合区域的融合蛋白(同样，胞内区FAS-IC 和55IC片段，即55DD，也被克隆进入ρGBT9 中，用来分离其它的IC-结合蛋白质，见下面的实例3)。为将ρ55IC 和ρ75IC 克隆进入ρGBT9中，使用了编码 ρ55TNF-R(Schall et al., 1990)和ρ75TNF-R(Smith et al., 1990) 的全长cDNA序列的克隆，其中胞内区(IC)被按如下方式切断：用EcoRI和SalI酶切出ρ55IIC编码片段，再按常规方法分离含ρ55IC编码序列的EcoRI-SalI片段，并将其嵌入ρGBT9载体中，该载体是由EcoRI和SalI在其多克隆位点(MCS)切开；用BspHI和SalI酶切出ρ75IC编码片段，再按常规方法分离含ρ75IC编码序列的BspHI-SalI片段，并加入Klenow酶以产生能插入ρGBT9载体的片段，该载体同样由SmaI和SalI切开。

然后将上述杂种(嵌合)载体与带有GAL4激活区的PGADGH载体共同转染HF7C酵母宿主细胞系，(分别进行，一与P55IC杂种载体共转染，另一个与P75IC杂种载体共转染)PGADGH载体同时还含来自人Hela细胞的cDNA库(所有上述载体，ρGBT9与携带Hela细胞cDNA库的ρGAD GH，以及酵母系作为MATCHMAKER双杂种体系的一部分，#PT1265-1都是从美国Clontech Laboratories, Inc.购买的)。根据其在缺乏组氨酸的培养基(His⁻培养基)中的生长能力来选择共转染的酵母，即表现为阳性转化体的生长克隆。再测试选出的酵母克隆表达lacZ基因的能力，即其LAC Z活性，这通过将X-gal加入培养基中进行，由lacZ基因编码的β-半乳糖苷酶使X-gal降解代谢，生成兰色产物。因而，兰色菌落表示活化的lac Z基因。GAL4 转录激活因子以活化形式存在于转化的克隆中，对lac Z基因的活化是必要的，即由前面的杂种载体之一编码的GAL4 DNA-结合区域与另一杂种载体编码的GAL4激活区域适当地结合，对Lac基因的活化是必要的。这种结合只有在融合于

每一GAL4 区域的两个蛋白能够稳定地相互作用(结合)的情形下才是可能的。因而，分离出的His+和兰色(LAC Z+)菌落是这样的菌落：它们被编码ρ55IC的载体和编码来自人体Hela细胞的能和ρ55IC 稳定结合的蛋白产物的载体共转染；或被编码ρ75IC的载体和编码来自人体Hela细胞的能和ρ75IC 稳定结合的蛋白质产物的载体共转染。

用常规方法，分离来自前述His+、LAC Z+酵母克隆的质粒DNA，并将其通过电击法打入大肠杆菌株HB101中，继而选择Leu+和抗氨苄青霉素的转化体，这些转化体携带有含AmpR和Leu2两种偏码序列的杂种ρGAD GH载体。所以，这些转化体是携带编码新近确定出能与 ρ55IC或ρ75IC 结合之蛋白质的序列的克隆。然后从这些转化的大肠杆菌中分离出质粒DNA，并按以下方式再测试：

(a)如前所述，将其用原始胞内区杂种质粒(携带ρ55IC 或ρ75IC 顺序的杂种ρGTB9)重转化成酵母菌株HF7。作为对照，携带非相关蛋白编码序列的载体如pACT-核纤层蛋白(lamin)，或单独的ρGBT9用来与ρ55IC-结合蛋白或ρ75IC-结合蛋白的编码质粒共转化。然后测试共转化酵母在单独的His^-培养基或在同时含不同浓度3-氨基三唑的培养基中的生长情况。

(b)用(a)中述及的质粒DNA 和原始胞内区杂种质粒及对照质粒共转化SFY526系的酵母宿主细胞，并测试其LAC Z+活性(β-gal形成即兰色产生的效率)。

上述测试结果表明：用菌落的颜色来测定时，在His^-培养基中菌落生长模式与LACZ 活性的模式充分一致，即His+的克隆也是LAC Z+。另外，在GAL4 DNA 结合区和激活区杂种质粒转染SFY526酵母宿主后测定在液体(理想培养条件下)培养物中的LAC Z活性，SFY526酵母宿主量有比HF-7酵母宿主细胞要好的GAL4转录激活因子对LAC Z的诱导性。

上述共转染的结果列于以下的表1中，从中明显可见，许多蛋白质被发现能与ρ55IC或ρ75IC结合，即：称为55.11的蛋白能与ρ55IC结合，和称为75.3和75.16的蛋白质能与ρ75IC结合。所有这些ρ55-IC-和ρ75IC-结合蛋白都是真正的人体蛋白，它们全都由人Hela细胞cDNA库中cDNA序列编码，这儿所说的cDNA序列与上述酵母双杂种分析体系中质粒ρGAD GH内的

GAL4 激活一区序列融合。

有趣地是，还发现了ρ55IC一些片段本身，即称为55.1和55.3的蛋白，能与ρ55IC结合。这也将在实例2中讨论。

表1 由双杂种体系分离的部分cDNA克隆特征概要

DNA一结合区杂种	激活一区杂种	菌落颜色	在液相培养物试样中 Lac Z 活性
pGBT9-IC55	---	白	0.00
pGBT9-IC55	55.1	兰	0.65
pGBT9-IC55	55.3	兰	0.04
---	55.1	白	0.00
---	55.3	白	0.00
pACT-Lamin	55.1	白	0.00
pACT-Lamin	55.3	白	0.00
pGBT9	55.1	白	0.00
pGBT9	55.3	白	0.00
pGBT9-IC55	55.11	兰	ND
---	55.11	白	ND
pACT-Lamin	55.11	白	ND
pGBT9	55.11	白	ND
pGBT9-IC75	75.3	兰	ND
pGBT9-IC75	---	白	ND
---	75.3	白	ND
pACT-Lamin	75.3	白	ND
pGBT9	75.3	白	ND
pGBT9-IC75	75.16	兰	ND
---	75.16	白	ND
pACT-Lamin	75.16	白	ND
pGBT9	75.16	白	ND

在以上表1中，编码GAL4 DNA-结合区和GAL4激活区的质粒和杂种列示如下:

DNA-结合区杂种:

ρGBT9-IC55: ρ55-TNF-R的全长胞内区(ρ55IC)

ρACT-Lamin: 无关蛋白-核纤层蛋白

ρGBT9: 载体本身

ρGBT9-IC75: ρ75-TNF-R的全长胞内区(ρ75IC)

激活区杂种:

55.1和55.3对应于ρ55-TTNF-R胞内区的片段

55.11是与ρ55-TNF-R相关的新蛋白

75.3和75.16是ρ75-TNF-R相关的新蛋白

上述克隆的cDNA编码以下蛋白: 新ρ55IC-和ρ75IC-结合蛋白的55.11, 75.3和76.16, 用常规DNA测序方法来测序。所有这些蛋白编码序列的部分序列列于图1a-c中, 其中图1(a)列出了编码蛋白55.11的序列cDNA, 图1(b)列出了编码蛋白75.3的cDNA部分序列, 图1(c)列了编码蛋白75.16的cDNA部分序列。在图1(d)中, 显示了由图1(a) 的核苷酸顺序推断出的蛋白质55.11的氨基酸顺序。

然而, 应该提到的是: 编码55.11蛋白的cDNA部分顺序也已被Khan等人(1992)在人脑cDNA序列的研究中报导过, 该研究旨在建立新的快捷准确的方法, 用于人脑cANA测序及绘制其物理图谱和遗传图谱。但Khan等人没有对55.11用cDNA序列编码蛋白的任何其它特征和功能提供信息, 在其研究中这些功能及其它分析并不是Khan等人研究的目的。

55.11蛋白的分析与鉴定

(a)方法与材料

(i)55.11的cDNA的克隆

根据对55.11蛋白的cDNA的分析表明: (例如, 见下面的Nothern 印迹法分析), 由双杂种筛选方法所克隆的上述55.11cDNA仅代表了55.11cDNA的部分序列, 含核苷酸925-2863之间的片段, (见图1(a)), 该核苷酸序列编码氨基酸309—900之间的片段(见图1(d))。55.11cDNA的其余部分(核苷酸1—924之间的区段(图1(a))编码氨基酸1—308之间的片段(图1(d)), 由常规方法得到, 即通过PCR技术从人体胎儿肝细胞cDNA库中克隆出来。

55.11全长核苷酸序列(图1(a))由双脱氧链终止法从二个方面做了测定

(ii)双杂种系的β-半乳糖苷酶表达试验

β-半乳糖苷酶表达试验如上述进行。但某些试验中用PVP16载体(含VP16活性区)代替了PGAD-GH(Gal4活性区)载体。由cDNA插入片段编码的蛋白中氨基酸残基的编号参照SWiss-Prot数据库。用PCR法获得缺失突变体,和用寡核苷酸指导的诱变获得点突变(Kunkel,(1994)。

(iii)Northern分析

采用常规技术,用TRI试剂盒(美国分子研究中心公司产品,Cincinnari Oh., U.S.A)分离的总RNA,在甲醛/甲酰胺缓冲液中变性后,用琼脂糖/甲醛凝胶进行电泳,再在10×SSPE缓冲液中印迹到Gene Screen Plus膜(美国杜邦公司产品)上。印迹点与55.11的部分cDNA杂交(见上,核苷酸925—2863之间的区段),用随机引物试剂盒(德国伯林格,曼海姆生化公司产品)作同位素标记,严格冲洗后,放射自显影一周。

(iv)Hela细胞中55.11cDNA的表达和55.11蛋白结合于ρ55IC的谷胱甘肽硫基转移酶融合蛋白的结合

合成谷胱甘肽硫基转移酶(GST)与ρ55IC的融合蛋白(GSF-ρ55IC)和谷光甘肽-S-转移酶与第345个氨基酸以下序列切除的ρ55IC的融合蛋白(GST-ρ55IC345)并吸附到谷胱甘肽一琼脂糖凝胶珠上,如以下例2所述。(参照Smith和Corcoran,1994); Frangioni和Neel,1993)。55.11的cDNA(1—2863核苷酸即55.11全长的cDNA)、FLAG—55.11的cDMA和莹光素酶的cDNA是表达在Hela细胞中。FLAG-55.11是55.11蛋白中309—900氨基酸残基的编码区段,(55.11部分cDNA(核苷酸925—2863)通过双杂种筛选系克隆)N端与FLAG八肽相连。Hela细胞中融合蛋白的表达是由四环素调控的表达载体(HtTA-1)来实现。这种Hela细胞表达四环素调控的反式激活因子(见以下例2, Gossen和Bujard,1992)。所表达的蛋白用(^{35}S)甲硫氨酸(^{35}S)半胱氨酸(美国杜邦公司、英国Amer-sham公司产品)进行代谢法放射性标记,接着裂解Hela细胞,再进行免疫沉淀,然后将标记蛋白结合到谷胱甘肽硫基转移酶融合蛋白,这些都按下述(例2)的方法进行,但在细胞裂解缓冲液中用0.5%代替0.1%NonidetP-4。用抗含有氨基酸309—900区段的55.11的谷胱甘肽硫基转

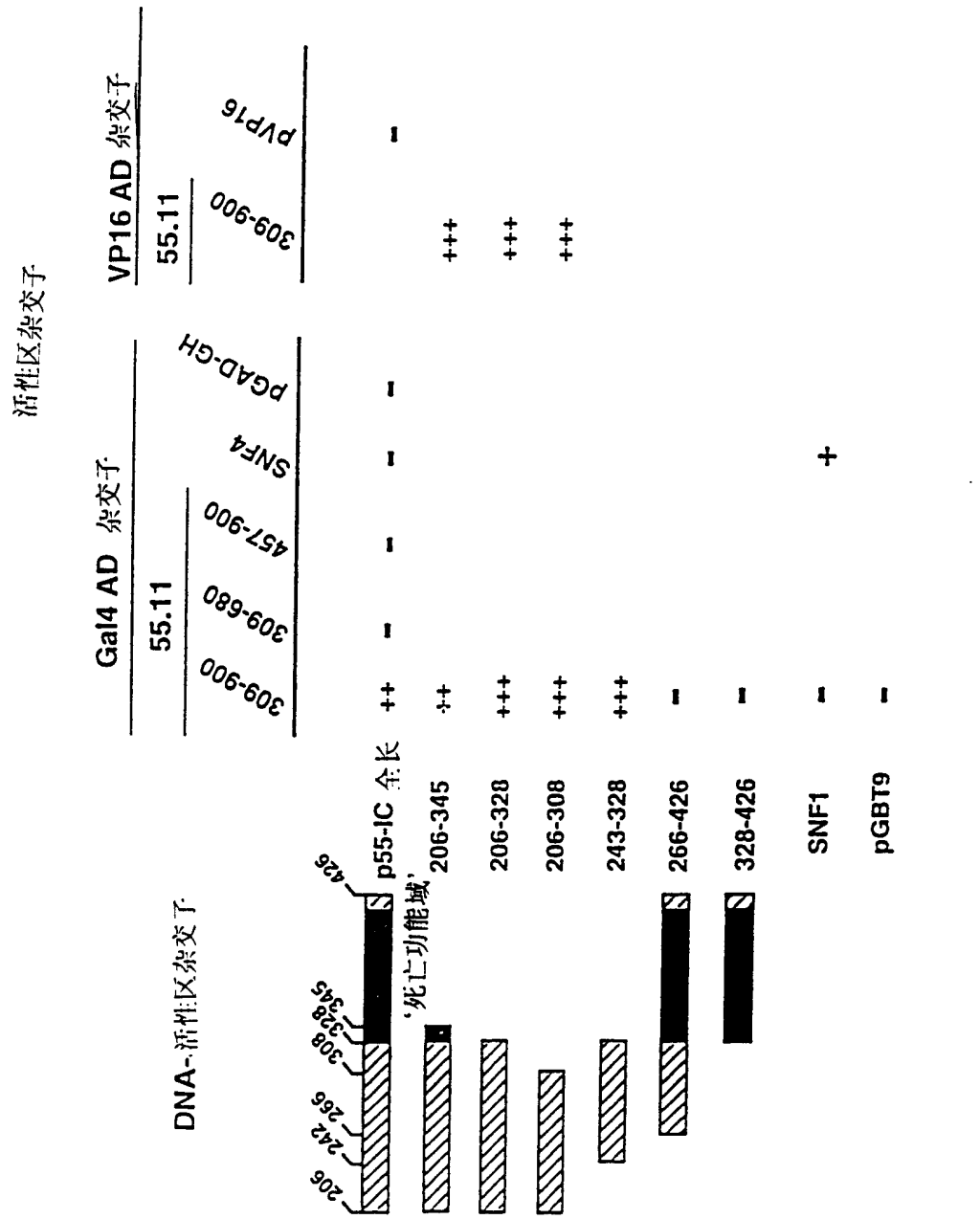
移酶融合蛋白的免抗血清(1:500稀释),与抗FLAG八肽鼠单克隆抗体,得到55.11与FLAG-55.11免疫沉淀(M_2;Eastman Kodak; 5μg/ml细胞裂介物)。

(b)转化酵母中55.11蛋白与ρ55IC的结合

这一研究是要搞清55.11和ρ55IC结合的性质,特别是这两种蛋白中与结合有关的区段,为此目的,采用了上述双杂种方法,以带有全长和缺失突变的ρ55IC的"DNA结合区"构建体作为"诱饵"去结合"捕获物"即构建物中编码的部分55.11蛋白的氨基酸序列(残基309—900,如同最初所分离的产物)去融合GAL4AD和VP16AD载体中的"活性区"。进而,还构建了55.11的各种缺失突变株,并与GAC4AD载体的"活性区"融合。(如只带有309—680和457—900氨基酸片段的55.11突变体)。在转染的SFY526酵母细胞中检测了各种"结合区"构建体与各种"活性区"构建体的结合。并经过双杂种β-半乳糖苷酶表达滤膜结合试验,测定了结合性。非相关蛋白SNF1和SNF4分别作为"结合区"和"活性区"构建体的正对照;Ga14(PGAD-GH)和VP16(PVP16)空载体作为"活性区"构建物的负对照,Ga14(PGBT9)空载体作为"结合区"构建体的负对照。测定结果如下表2所示,表中符号"+++"和"++"分别表示测定开始后20—60分钟内显示颜色的变化情况(正结合结果);"—"表示测定开始后24小时内不显色(负结果)。表中空白的地方表示未测定的结合试验。

表 2

在转化酵母中55.11蛋白与P55IC的结合



从以上表2所列结果可以推断，55.11是与P55IC的一定位置结合，这一位置不同于P55IC的“死亡功能域”(328—426氨基酸残基)

55.11蛋白与致死区缺失(表2中206—328构建株) 的截短P55IC蛋白的结合比与未截短的P55IC的结合更有效。

55.11也能与C末端进一步截短的蛋白构建体(构建体206—308) 以及死亡功能域和近膜区缺失的构建体(构建体243—328)结合。但是55.11蛋白不参与氨基末端缺失至第266个氨基酸的构建体结合(见表2)。这些发现表明，55.11的结合位置位于P55IC的243—308之间的氨基酸区域，结合位置的N末端在243—266之间的氨基酸区域。

从来源于克隆的“捕获物”构建体(该构建体含有Ga14活性区)55.11cDNA转移到含VP16活性区的捕获构建体中时，并不降低55.11蛋白与P55IC的结合有效性(表2)。因而，与结合有关的结构似乎位于55.11分子内，但似乎不包括55.11与活性区的融合位置。

然而，55.11与P55IC蛋白结合，可因55.11蛋白C末端(55.11构建体309—680)或N末端(55.11构建体457—900)的限制性切除受到阻止。(309氨基酸残基由最初以双杂种法筛选出的部分cDNA编码的55.11蛋白的第一个氨基酸残基)。

观察到的55.11与P55IC的结合似乎是特异性的。因为55.11并不与其它蛋白结合，包括肿瘤坏死因子/神经生长因子受体家族的三个受体蛋白(P75-R，Fas/APO1和CD40)以及其它蛋白，如核纤层蛋白和细胞周期蛋白D(资料未发表)。值得强调的是，在测试的其它肿瘤坏死因子/神经生长因子受体蛋白中，也测试了其含有胞内区的片断，即人的FAS-R(氨基酸残基175—319)，CD40(氨基酸残基216—277)和P75-TNF-R(氨基酸残基287—461)，其中没有一种与55.11结合(资料未发表)。

(c)以55.11 cDNA为探针，对几种细胞系的RNA进行Northern分析及全长55.11 cDNA的克隆。

试验细胞系包括Hela细胞系，CEM细胞系，Jurkat细胞系和HepG2细胞系，它们分别来自于人类上皮癌细胞，急性淋巴T细胞白血病，急性T细胞白血病和肝癌细胞。最初分离的cDNA(核苷酸925—2863)用作探针，样本含10μg RNA/泳道。Northern分析结果如图2所示，其中重现了

Northern印迹。

由图2可看出，以55.11cDNA为探针，在几种细胞系中进行Northern分析。发现有一个约3kB的单杂交转录本，比最初分离的55.11 cDNA(3kB)要大。利用与55.11序列相对应的寡核苷酸引物，经PCR技术(聚合酶链式反应)克隆了长度约1kB的5′端延伸序列，5′端延伸序列长度加上最初克隆的cDNA长度总和接近于55.11转录本长度。3kB cDNA包括了上述两部分(1kB的序列和2kB的序列)，它能在转染的Hela细胞中有效表达(见下)并产生约84kDa的蛋白质。这表明3kB CDNA含有一翻译起始位点。

(d)55.11蛋白与含有P55IC片段的谷胱甘肽硫基转移酶融合蛋白的体外结合。

为了确定55.11的确能与P55IC结合，并排除酵母蛋白参与这一过程，检测了由细菌产生谷胱甘肽硫基转移酶P55IC融合蛋白与转染HeLa细胞产生的，由3kB 55.11 cDNA(55.11全长)编码的蛋白之间的体外相互作用。在该研究中，编码全长55.11，FLAG-55.11(由最初克隆的部分cDNA编码的55.11的309—600氨基酸残基融合FLAG8肽的N末端)和荧光素酶(作对照)的cDNA均在转染的HeLa细胞中表达并用[^{35}S]甲硫氨酸和[^{35}S]半胱氨酸进行代谢法放射性标记。下列蛋白与GST融合，全长的PP55IC(谷胱甘肽—P55IC片段)和P55IC片段(谷胱甘肽P55IC345)，它由P55IC的C末端截至345个氨基酸残基，去掉大部分“死亡功能域”形成(见表2)。谷胱甘肽单独作为对照。当全长的55.11蛋白用于结合谷胱甘肽融合蛋白时，抗55.11蛋白的抗体用来免疫沉淀转染细胞的裂解物，或当FLAG-55.11融合蛋白用于结合谷胱甘肽融合蛋白时，抗FLAG 8肽的抗体用来免疫沉淀转染细胞的裂解物。蛋白分析通过SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE，10%丙烯酰胺)进行，随后进行放射自显影。

图3A和B显示了以上SDS-PAGE凝胶放射自显影的结果。图3A示明全长的55.11蛋白(55.11-全长)与各种谷胱甘肽融合蛋白的结合，图3B示明Flag-55.11融合产物与各种谷胱甘肽融合蛋白的结合。图3A中最右边的泳道表示对照的细胞裂解物的免疫沉淀结果，这些细胞是仅用全长55.11转染，并由抗55.11的抗体(α 55.11Abs)对其进行免疫沉淀。图3B中最右边泳道表示对

照的细胞裂解物的免疫沉淀结果，这些细胞是仅用FLAG-55.11转染，并用抗FLAG的抗体(α FLAG-Abs)进行免疫沉淀。

因而，从图3A和B的结果显而易见，由全长55.11cDNA编码的蛋白能够在HeLa细胞中表达，并且能够与含有全部P55IC(谷胱甘肽-P55IC)或失去大部分致死区的截短的P55IC(谷胱甘肽-P55IC345)的融合蛋白相结合(图3A)。全长的55.11蛋白不与谷胱甘肽本身结合(对照)。与此相似，HeLa细胞中表达的由最初克隆的55.11部分cDNA编码的蛋白质与FLAG 8肽能形成融合蛋白(FLAG-55.11)，该融合蛋白在体外能与谷胱甘肽－P55IC和谷胱甘肽－P55IC345结合，但不能与谷胱甘肽本身结合(图3B)。于是以上结果提供另外(见以上(b))的证据，证明55.11与P55IC“死亡功能域”的上游区域相结合，亦即与接近P55IC跨膜区的区域相结合。

此外，以上研究还显示，根据本发明结果，已成功地合成了抗55.11的抗体(图3A)。

(e)人类55.11蛋白与低等有机体存在的相关蛋白的氨基酸推断序列比较以及55.11蛋白序列特征

正如本发明以上所提到的，全长的55.11cDNA已被克隆和测序(见图1(a)中核苷酸序列)并且根据cDNA序列推断出的55.11的全部氨基酸序列(见图1(d)氨基酸序列)。数据库(Gene Bank TM/EMBL Data Bank)检索表明了人类55.11cDNA部分序列(登记号T03659，Z19559和F091287)和鼠中相应物(登记号X80422和Z311477)已在cDNA库随机测序中得到确定。存在于人肝癌HC10细胞培养物中一个含596个氨基酸的人蛋白的cDNA编码序列，与55.11cDNA编码序列相似。但是肝癌蛋白却缺失与55.11相应的N-末端片段(氨基酸1—297)，而且还不同于55.11，在55.11对应的297—377和648—668氨基酸区段内。资料库检索还示明，在酵母(Saccharomyces)植物、(Arabidopsis thaliana)、蠕虫(Caenorhabditis elegans)中也存在与55.11有很高的序列同源性的蛋白。55.11蛋白似乎具有进化保守功能。在酵母中，已知有两种酵母蛋白(开放读码框YHR027C和SEN3)的DNA序列与55.11相似，大小也与55.11差不多。只有通过基因克隆的测序才能了解YHR027C，而SEN3已经作为一个cDNA分子而被克隆出来。55.11中与SEN3相似的位点，与其在

YHR027C中相似的位点也有关联。虽然证据表明，55.11与YHR027C的相似性要超过其与SEN3的相似性。从植物(拟南芥菜)和蠕虫(Caenorhabditis elegans)蛋白获得DNA序列的信息，尽管还只是部分序列，但清楚地显示这些蛋白与YHR027C酵母蛋白一样都具有对55.11相似性。至今为止，四种蛋白中性质已被阐明的只有酵母的SEN3，而它与55.11的同源性已被限定。SEN3被确认是酵母中20S蛋白酶体激活因子的P112亚基的对等物(20S蛋白酶体是26S蛋白酶体的水解核心)[Rechsteiner等，1993. De Martino 等，1994](M.R.Culbertson和M.Hock strasser，私人通讯)。

图4图解地表明了人类55.11蛋白与上述提到的存在于低等有机体中相关蛋白的氨基酸推断序列的比较。图4进行比较的氨基酸序列由下列cDNA编码：55.11cDNA(见图1(d))(SEQ ID NO:14)；一开放读码框(YAR027C)，存在于酵母(Saocharomyces cerevisiae)第八染色体的粘粒中；(核苷酸21253—24234，登记号U10399)(SEQ ID NO:15)；编码酵母蛋白的SEN3 cDNA(登记号L06321)(SEQ ID NO:16)；植物(Arabidopsis thaliana)蛋白的部分cDNA(登记号T21500)(SEQ ID NO:17)；以及蠕虫(Caenorhabditis elegans)蛋白的部分cDNA(登记号D27396)(SEQ ID NO:18)。55.11的“KEKE”序列用实线表示，AYAGS(x)8LL序列用虚线表示。用GCG软件的PILEUP和PRETTYBOX程序将序列排列成直线。用来增大排列直线的间隔以破折号表示。人55.11氨基酸序列中的各种序列的特征或基元，如下所述:除了lys 614到Glu632范围内的一个“KEKE”重复序列外(图4中的底下黑线)，55.11编码的蛋白内没有发现含保守的氨基酸序列基元。这种“KEKE”序列存在于许多蛋白质中，包括了蛋白酶体亚基和分子伴娘蛋白。“KEKE”序列能促进蛋白复合体的缔合(Realini et al,1994),AYAGS(X)$_8$LL序列在55.11蛋白中出现了两次，(位点479和590见图4)；对该序列作用意义未见描述。

(f)P55IC中与55.11蛋白结合有关的区域的序列特征

如以上所描述的，(见(b)和(d),55.11蛋白结合到P55IC的243—308氨基酸之间的区域内(该结合位点的N末端是在243—266氨基酸残基之间)这一区域为“死亡功能域”的上游，并且更接近于P55-TNT-R的跨膜区。在55.11与之结合的P55IC区域内，富含脯氨酸、丝氨酸和苏氨酸残基。然

而，这个区域并不含在其它几种细胞因子受体中出现的RPM1和RPM2富含脯氨酸的基元(Oneal和Yulee,1993)。在243—266氨基酸残基之间的区段中，(该区段缺失能阻止P55-R结合到55.11)，(见(b)和(d)以及表2)，两个丝氨酸和两个苏氨酸再接着为脯氨酸残基的结构能通过MAP激酶，CDC2和其它依赖于脯氨酸的激酶而成为磷酸化作用的潜在位点(Seger和Krebs，1995)。受体蛋白中这个位点的磷酸化作用可能影响它与55.11蛋白的结合。

鉴于上述关于蛋白55.11和它与P55IC的结合的研究结果，可以得到结论，根据本发明，发现了一个新的蛋白质，它能结合到P55IC“死亡功能域”的上游的特别区域，这种结合可以影响TNF介导的活性而不会引起细胞死亡。55.11结合区域先前已表明与氧化氮合成酶的诱导有关(Tartaglia et al,1993)，并似乎与由肿瘤坏死因子对神经鞘磷脂酶的活化也有关。(Wiegmam et al，1994)。因而，55.11与P55-TNF-R胞内区(P55IC)结合可能影响或涉及下列过程：(i)为以上述及的或其它TNF效应提供信号；(ii)蛋白的折叠或加工(正如通过55.11与一个26S蛋白酶体亚基的相似性所提出的)；(iii)P55-TNF-R活性的调节或表达。

例2

P55TNF受体胞内区(P55IC)的自缔合能力、引起细胞死亡的能力及其它特征和活性及相关Fas/AP01受体的胞内区

正如在上面例1中所述，已发现，P55-TNF-R的胞内区(P55IC)具有自我结合的能力，而且发现P55IC的片断即蛋白55.11和蛋白55.3也能与P55IC结合。

已知TNF与P55-TNF-R的结合，能导致对带有该受体的细胞的杀细胞效应。而且抗这种受体胞外区的抗体自身也能触发这种效应，该效应与抗体与受体交联的有效性相关。

此外，突变研究[Tartaglia et al(1993)；Brakebusch et al.,(1992)]表明P55-R功能取决于它胞内区的完整性。所以也表明TNF的杀细胞效应的信号启动是作为两个或更多的P55-R的胞内区(P55IC)自缔合的结果产生的，而这种自缔合是受体的聚集作用引起的。根据本发明，这些结果为这一见解提供了进一步的证据。这些结果表明，在没有跨膜区或

胞内区的情况下，细胞内P55-R的胞内区的表达将触发细胞的死亡。这些自由P55-R胞内区表现出自我缔合的能力，这也可能是它们具有不依赖于TNF的作用能力的原因。全长P55-R的信号引发作用依赖于TNF的刺激，这一事实表明了受体跨膜区或胞外区的反射活性，它减少或防止了自缔合的产生。

P55-R的胞内区(P55IC)自我缔合能力是在试图克隆与这个受体相作用的效应子蛋白时极偶然而饶幸地被发现的(见上述例1)。为此目的我们应用了上述“双杂交”技术。除了发现新的蛋白55.11能与P55IC结合外，还发现了含cDNA序列的其它三个克隆的HeLa细胞cDNAs，编码P55-R的部分胞内区，这表明P55IC能够自我缔合。这些克隆中的两个是相同的，含有一个编码氨基酸328—426的插人片段(标示克隆55.1)编码P55IC的蛋白片段55.1，第三个则含有一个较长的插人段，编码氨基酸277—426之间的片段(标示为克隆55.3，编码P55IC的蛋白片段55.3)。

此外，我们分析了细菌产生的P55IC的两种嵌合蛋白在体外相互作用。其中一个蛋白与麦芽糖结合蛋白(MBP)融合，另一个嵌合蛋白，与谷胱甘肽—硫基转移酶(GST)融合。这些嵌合蛋白用常规方法构建、克隆并且表达。在它们表达之后，通过测定上述的细菌产生的嵌合蛋白GST-IC55(Mr-51kD)和MBP-IC55(Mr-67kD)的相互作用来测定P55-R胞内区(P55IC)的自我相互作用。等量的GST-IC55嵌合蛋白(图5中的样品泳道1—4)或单独GST(图5中样品泳道5—8)结合到谷胱甘肽—琼脂糖珠上(Sigma)，然后与等量的MBP-IC55融合蛋白在下列其中一种缓冲液中温育:

(i)缓冲液I(20mM Tris-HCl，PH7.5，100mM KCl，2mM $CaCl_2$，2mM $MgCl_2$，5mM DTT，0.2% Triton X100，0.5mM PMSF，5%甘油)。图5中的泳道1和泳道5的样品是用这种缓冲处理的。

(ii)含有5mM EDTA代替$MgCl_2$的缓冲液I。图5中的泳道2和泳道6中的样品用该缓冲液处理。

(iii)含有250mM KCl代替100mMKCl的缓冲液I，图 5中泳道3和泳道7中的样品是用这样的缓冲液处理的。

(iv)缓冲液I含有400mMKCl代替100mMKCl，图5中泳道4和泳道6中的样

品是用这样的缓冲液处理的。

在4℃旋转温育2小时后，琼脂糖珠用同样的缓冲液洗涤，接着在SDS—PAGE缓冲液中煮沸，然后通过PAGE电泳。随后将胶上的蛋白印迹到一个硝酸纤维素膜上，然后用一个抗MBP的多克隆抗血清染色。图5表示这个染色western印迹分析的结果，泳道1—8中的样品是前面已述的。

从图5中，可明显地观察到P55IC-MBP嵌合蛋白与P55IC-GST嵌合蛋白的结合(泳道1-4)与二价阳离子无关，且不受高浓度盐离子的影响(0.4MKCl)。由此可以得出P55IC具有自我缔合能力的结论。

为了评估P55IC自缔合的作用意义，我们试图在对TNF杀细胞效应敏感细胞的细胞质中表达P55IC。考虑到P55IC有可能转变或对细胞有毒，我们选用一种可诱导的方式表达它。即利用最近才发展起来的，被严紧调控的四环素调控的哺乳动物表达系统(Gossen和Boujard, 1992)。P55IC的表达引起细胞大量死亡(图6，右栏)。垂死细胞表现出的细胞表面泄漏与TNF杀死细胞过程中观察到的现象相同。P55IC构建体转染细胞，在四环素存在的条件下，HD10—3调控的构建体的表达降低了10^5倍，但仍引起某些细胞的死亡。尽管其显著低于没有四环素存在时所观察到的结果。(图6，左面)。作为对照，用含有萤光素酶cDNA的对照构建体转染的细胞，未见死亡迹象(结果未发表)。

无跨膜区或胞外区的受体表达时，P55IC能引发细胞死亡。这提供了进一步的证据表明，该区与信号引发有关。此外，它表明没有受体蛋白的其它部分，在这种信号引发中起直接作用。通过研究突变对P55IC功能的影响包括发明中那些研究的突变体表明，位于所氨基酸326—407残基之间的氨基酸区段对P55IC的功能是最关键的。这个区域与两个其它受体蛋白的胞内区表现 出明显地序列相似性。这两个受体分别是进化上与P55TNF-R相关的Fas受体和CD40受体，其中Fas受体能引发细胞死亡信号(Itoh et al, 1991; Oehm et al,1992)而CD40受体能促进细胞生长(Stamenkovic et al, 1989)。因此，该区域的序列似乎构成了一保守基元，并在信号引发中起着某种重要作用。因为它与已知的酶促活性的基元特征不相似，因而它似乎是以一种间接的方式产生信号。即它可能是信号酶的停靠位点或传送刺激

信号给信号酶的蛋白的停靠位点。P55IC，Fas受体和CD40都能被抗它们胞外区的抗体所刺激。而且表明，这种刺激作用与抗体交联到受体上的能力有关。因而，似乎信号的引发是由于胞外区的聚集引起两种或更多的胞内区相互作用的结果。在一些研究中也显示，这种相互作用与受体信号的启动有关(Brakebusch et al, 1992)，这些研究表明，由于胞内区突变而使受体失去功能，即对其表达的正常受体的功能有一种“显性失活”效应。P55IR对TNF反应产生聚集作用，被认为是以一种被动的方式发生的，不过是因为每个以同源三聚体的形式出现的TNF分子能结合两个或三个受体蛋白分子。然而，本发明的发现表明，该过程的发生稍有不同。

P55IC的自我缔合的倾向表明，这个区域在其聚集诱导中起着激活作用。进而，P55IC的活化似乎足以启动信号，因为当它不依赖其它受体分子表达时，P55IC能在没有TNF或其它外来刺激时触发细胞死亡。但是当它作为全长的受体表达时， P55-TNF-R不能起信号作用，除非受到TNF刺激才有可能。所以有人假设，当P55-TNF-R被激活时，TNF实际上克服了某些抑制机制，这些机制阻止胞内区的自缔合， 且抑制作用是由于P55IC与受体蛋白其余部分联接。这种抑制作用的产生可能是由于跨膜区和细胞外区域对胞内区施加的取向效应，或由于某些其它蛋白与受体的缔合，或可能只是由于允许定位于细胞质膜上的受体蛋白数量受到限制。值得注意的是，该调控机制相当有效，据估计，仅一个TNF分子结合到一个细胞，就足以引发该细胞的死亡。

不依赖配位体自发产生的信号，能导致由该受体调控的过程出现广泛混乱。已知的最恰当的例子是生长因子受体的失控。由于突变而自发产生的起始信号，如那些能引起受体自发聚集的信号，在肿瘤细胞的失控生长中起着重要的作用。众所周知， TNF效应诱导过度，是引起许多疾病的致病原因。P55-TNF-R的自由胞内区(P55ICs)不依赖TNF的信号引发能力，可能对这种过度效应起作用。看来有这种可能，或许某些病毒和其它病原体的细胞致病作用，并非来自于它们的直接杀细胞效应， 而是来自于P55-TNF-R的胞内区的蛋白水解作用，导致了类似TNF的杀细胞效应。

为进一步阐明P55IC中与自缔合能力有关的区段及不依赖配基的细胞毒

性， 也为了检测在TNF/NGF受体家族中的其它相关成员(例如FAS-R)是否也具有能自缔合的胞内区和不依赖配位体的效应，下面还进行了详尽的研究。

（ａ）一般方法与材料

（ｉ）双杂种法筛选与双杂种中β－半乳糖苷酶表达的检测

用ＰＣＲ技术克隆出一些ｃＤＮＡ插入片段，这些插入片段克隆自于我们实验室以前克隆出的全长cDNA，或来自于购买的cDNA库,它们编码P55-IC和它的突变体、Ｆａｓ－ＩＣ及其它蛋白（见表３）。用含上述cDNA的PGBT-9和PGAD-GH 载体（分别含ＤＮＡ结合区（ＤＢＤ）和活性区（ＡＤ））转化酵母（ＳＦＹ５２６报告系（Bartel等,1993），β－半乳糖苷酶在其中的表达通过液体测试法(Guarente,1983）测定，也可用滤膜结合试验测定，两者都产生了本质相同的结果（未发表）。利用ＨＦ７ｃ酵母报告系，按照生产厂家的推荐，从购买的Ga14AD－标记的Hela细胞cDNA库中(Clontech, Palo Alto, Ca., 美国）用双杂种筛选法(Fields and Song,1989)筛选出能与Ｐ５５－Ｒ胞内区（Ｐ５５－ＩＣ）结合的蛋白质。分离出的克隆的阳性通过以下法测定（ａ）在５mM3-氨基三唑存在下生长时，转化酵母对组氨酸的质子转移作用，(b)β－半乳糖苷酶的表达，（ｃ）特异性测试（与ＳＮＦ$_4$及融合于Ga14DBD的核纤层蛋白之间的相互作用）。

(ii)细菌合成的Ｐ５５－ＩＣ融合蛋白的体外自缔合

谷胱甘肽Ｓ－转移酶（ＧＳＴ）及谷胱甘肽Ｓ－转移酶-P55-IC融合蛋白（ＧＳＴ－Ｐ５５－IC)的合成按文献叙述的方法进行（Frangioni和Neel, 1993; Ausubel等, 1994)。麦芽糖结合蛋白（ＭＢＰ）融合蛋白是通过PMalcRI载体(New England Biolabs)获得，并在直链淀粉树脂柱上纯化。MBPP与ＧＳＴ融合蛋白相互作用的研究通过谷胱甘肽－琼脂糖珠依次与ＧＳＴ和MBPP融合蛋白温育进行（5μg蛋白/２０μl胶珠，第一次温育１５分钟，第二次温育２小时，都在４℃下进行）。与ＭＢＰ融合蛋白的温育在下面的缓冲液中进行，即其含：２０mM Tris-HCL,PH7.5, 100mM Kcl, 2mM $Cacl_2$, 2mM $MgCl_2$, 5mM二硫苏糖醇（DDT），０.２％Triton×100,

0.5mM苯甲基硫代氟代物,5%(v/v)的甘油,或在指定情况下,在含0.4MKCl或0.5mM EDTA代替$MgCl_2$的上述缓冲液中进行温育。ＭＢＰ融合蛋白的缔合作用是将与谷胱甘肽-琼脂糖珠缔合的蛋白质通过ＳＤＳ聚丙烯酰胺凝胶（１０％丙烯酰胺）电泳进行分析，再经过Western印迹法分析。在上述印迹法分析中用抗ＭＢＰ的小鼠抗血清（本实验室合成）与辣根过氧化物酶相连的羊抗小兔免疫球蛋白作探针。

(iii)Hela细胞中P55-R及其片段的诱导表达

表达四环素调控的反式激活蛋白因子的Hela细胞是由Gossen与Bujard发展起来的（the HtTA-1克隆(Gossen Bujard,1992)),该细胞生长在Dulbecco的改良Eagle's培养基上，即含１０％的胎牛血清，100μg/ml青霉素，100μg/ml链霉素和0.5mg/ml新霉素的培养基。编码Ｐ５５－Ｒ或其片段的cDNA插入片段被转入四环素调控的表达载体（pUHD10-3,由H.Bujard惠赠）。再通过磷酸钙沉淀法（Ausubel等1994)用上述表达载体(5μgDNA/6cm平板)转染细胞。四环素(1μg/ml)存在或不存在的情况下，在转染后的指内时间对转染蛋白的瞬间表达效果进行测定。用pUHD10-3载体中的人Ｐ５５－ＩＣcDNA转染细胞，并建立稳定转染的细胞克隆，这是在四环素存在情况下，通过用抗潮霉素的质粒转染cDNA到HtTA-1细胞，并用潮霉素200μg/ml筛选出抗性克隆来实现的。移去四环素后得到cDNA表达。一般情况下，四环素将始终存在于细胞生长培养基内。

(iv)由Ｐ５５－Ｒ及其片段诱导表达而触发的类似ＴＮＦ效应的测定

所诱发的受体和ＴＮＦ的表达对细胞生存力的影响通过中性红吸收方法（Wallach, 1984)测定。ＩＬ－８基因表达的诱导是通过Northern分析来测定。ＲＮＡ用ＴＲＩ试剂盒（Molecular Research Center,Inc.)分离，并在甲醛/甲酰胺缓冲液中变性，通过琼脂糖/甲醛凝胶电泳，然后在１０×ＳＳＰＥ缓冲液中印迹到“GeneScreen Plus”膜上（Du Pont）。上述这些过程都按常规技术进行。滤膜接着用ＩＬ－８cDNA探针杂交(Matsushima,等1988,核苷酸No.1-392)。再通过随机引物盒进行放射性标记（Boehringer Mannheim biochemica, Mannheim, Germany)，根据生产厂家的要求，严格冲洗。放射自显影１－２天。

（ｖ）ＴＮＦ受体表达的测定

按氯胺－Ｔ法用^{125}Ｉ标记ＴＮＦ，通过计算与细胞的结合量就可以测定出ＴＮＦ受体在含１×１０^{6}细胞的样品中的表达量，此法同前所载(Holtmann and Wallach,1987)，ＴＮＦ受体的表达也可通过ＥＬＩＳＡ来测定。即按照测定可溶性ＴＮＦ受体的方法（Aderka等,1991)、但不同之处是用RIPA缓冲液（10mM Tris-HCL,PH7.5,150mM NaCl，1%NP-40,1%脱氧胆酸盐,0.1%SDS和1mM EDTA)来分解细胞(70μl/10^{6}细胞)稀释检测样品。从尿中纯化出的可溶性Ｐ５５－Ｒ用作标准对照。

（ｂ）通过Ｐ５５－Ｒ胞内区（Ｐ５５－ＩＣ）的突变分析来检测Ｐ５５－ＩＣ中与自缔合有关的区段

如上所述，Ｐ５５－ＩＣ能自缔合并触发对细胞的毒性作用，而且Ｐ５５－ＩＣ的有些片段能与全长Ｐ５５－ＩＣ结合。尤其是Ｐ５５－ＩＣ的其中一个片段（在上述例１中称为蛋白片段５５．１）能与全长cDNA结合，通过对它测序发现，它含有Ｐ５５－ＴＮＦ-Ｒ的第３２８－４２６之间的氨基酸残基，而该片段也存在于Ｐ５５－ＩＣ中。进一步还发现（见下面）。上述片段，即蛋白片段５５．１，能自缔合并触发对细胞的毒性作用。因此，该Ｐ５５－ＩＣ片段称为“死亡功能域”（或称“死亡区”），它位于人Ｐ５５－Ｒ的第３２８－４２６之间的区段，很可能是由第３２８－４１４之间的氨基酸残基组成。

Ｐ５５－ＩＣ的“死亡功能域”具有自缔合能力，这一事实是偶然发现的。用双杂种技术(见上例1)在Hela细胞cDNA文库中筛选与该受体的胞内区结合的蛋白时，我们发现一些cDNA，它们的编码产物能特异性地结合胞内区－ ＧＡＬ４ＤＢＤ融合蛋白，其中有些克隆（如５５．１和５５．３）本身就编码Ｐ５５－Ｒ胞内区的一些片段（Ｐ５５－ＩＣ，表３中用星号标出）。

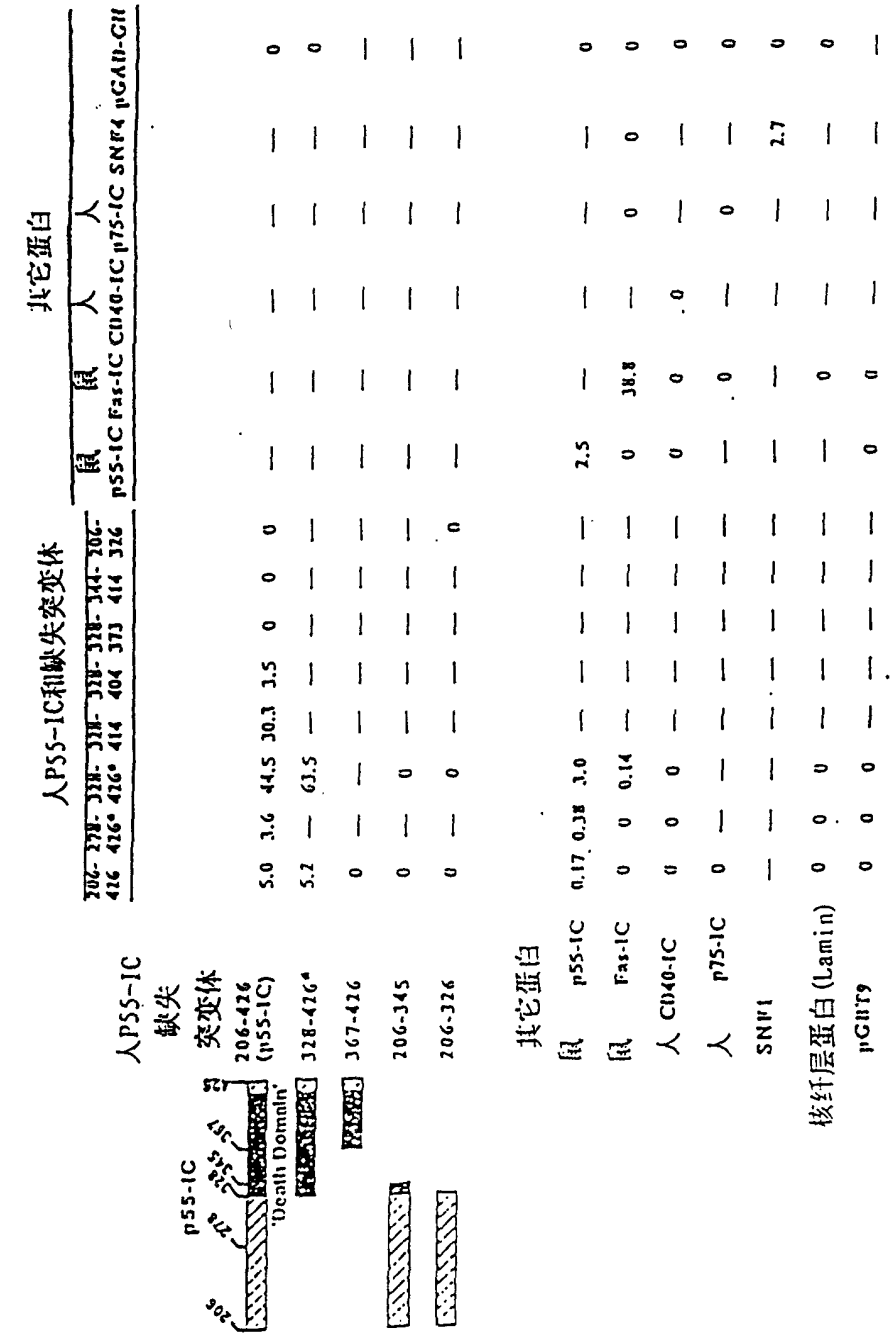
应用双杂种检测来测定Ｐ５５－ＩＣ自缔合的特异性程度并更精确地限定相关区段时，导致如下发现（表３）：（ａ）Ｐ５５－ＩＣ的自缔合作用限于“死亡功能域”中的区段，它的Ｎ端位于第３２８－３４４氨基酸之间的区段，它的Ｃ端接近于第４０４个氨基酸，即已报道的该区Ｃ端

（第４１４个氨基酸）的上游。（ｂ）“死亡功能域”上游近膜部分的缺失将增强自缔合作用，这表明该区段对缔合作用有抑制效应。（ｃ）鼠Ｐ５５－ＩＣ能自缔合，也能与人Ｐ５５－Ｒ的“死亡功能域”缔合。（ｄ）ＴＮＦ/ＮＧＦ受体家族的另三个成员：Fas/Ap01(FAS-R)、ＣＤ４０（Field和Song,1989)和Ｐ７５ＴＮＦ受体（smith等1990),对它们的胞内区自缔合的研究表明：Fas-IC,它能通过与P55-R"死亡功能域"有关的序列基元为细胞死亡提供信号,它也具有自缔合能力,并与P55－ＩＣ有某种程度的缔合。然而，ＣＤ４０－ＩＣ它提供生长促进信号（即使它也包括与“死亡功能域”相似的序列）。另外，Ｐ７５－ＩＣ则与Ｐ５５－ＩＣ没有结构相似性，它不能自缔合，也不与Ｐ５５－ＩＣ或Fas-IC结合。

表 3

在转化酵母中P55-R和Fas/APO1的胞内区自缔合作用:

通过双-杂种及-半乳糖苷酶表达测试法测定



上页表3表明了Gal4杂种构建体相互作用的定量测试结果，Gal4杂种构建体包含以下蛋白：人P55－R的胞内区及其各种缺失突变体（残基编号按(loetscher等,1990))(SEQ ID NO:25)；鼠 P55-R 胞内区（第334－454氨基酸之间的区域，编号按(Goodwin等1991)(SEQ ID NO:26)）；鼠Fas/Ap01(Fas-IC,166-306,编号按(Watanabe-Fukanaga等,1992))；人CD40(CD40-IC,216-277,编号按(stamenkovic等,1989))；人P75TNF受体（P75－IC，287－461，编号按（smith等,1990))。SNF，与SNF4用作缔合的正对照（Field和Song,1989),核纤层蛋白用作负对照(Bartel等,1993)。以Gal4DBD构建体(pGPT9)编码的蛋白垂直排列，以Gal4AD构建体(pGAD-GH)编码的蛋白水平排列。星号标出的两个缺失突变体在HeLa细胞cDNA库（Clontech Palo Alto,Ca, U.S.A.)的双杂种筛选中被克隆出来，它们是通过克隆在pGBT9中的P55－IC作“钓饵”而得到。在上述筛选中，4×10^6个检测的cDNA克隆中有4个是阳性发现其中三个克隆对应于人P55－RcDNA的某些片段（两个克隆是相同的，编码第328－426氨基酸之间的区域，另一个编码第277－426氨基酸之间的区域）。第四个克隆编码一未知蛋白。β－半乳糖苷酶的表达数据是两个独立转化体的测试平均值，并作为β－半乳糖苷酶的产物数量而列出来。（活性单位定义为：酶培养基$OD_{420}\times10^3$除以OD_{600}与反应时间的乘积。（OD是酵母培养物的光密度），时间以分钟为单位）。分析精度是0.05单位。在所有测试中，相同样本之间的差异低于平均值的25％（未测试）。

P55－IC谷胱甘肽S－转移酶（GST）细菌融合蛋白与P55－IC麦芽糖结合蛋白（MBP）融合蛋白相互作用的体外测试证实：P55－R能自缔合，且在缔合过程中与酶母蛋白无关（见上）。盐浓度的增加不影响缔合，EDTA也不影响缔合。

为了评估“死亡功能域”自缔合的作用意义，我们研究了P55－R或其片段的诱导表达影响细胞对于TNF细胞毒素的敏感性的方式，分析结果发表于图7，图7表达了用P55－R，其胞内区（P55－IC）或其片段（包括有“死亡功能域”）转染的Hela细胞中，杀细胞效应具有

的不依赖配体的触发作用。

在图7中，以图解形式表示了以下内容：编码不同种类ＴＮＦ受体的ＤＮＡ分子，这些受体存在于转染Hela细胞的载体中（图7最左侧）；利用四环素调控的表达载体，瞬间表达各种全长Ｐ５５－Ｒ（Ｐ５５－Ｒ），Ｐ５５－ＩＣ或其片段或作为对照的荧光素酶（luc)（每种蛋白都描述于图7的最左侧）的Hela细胞的表达能力（左侧及中间图块）和生存力（右侧图块）。空图块（左、中、右）表示在能抑制表达的四环素（1μg/ml）存在情况下的转染细胞；满图块表示无四环素存在条件下的转染细胞。ＴＮＦ受体表达在转染后２４小时测定，测定方法用ＥＬＩＳＡ，即利用抗受体胞外区的抗体（图7左侧说明），同时也通过测量放射性标记的ＴＮＦ与细胞的结合来测定（见中间）转染蛋白的杀细胞效应在转染后４８小时测定。展示的资料来自三个具有本质相同的结果的试验中的一个，在这些试验中，每个构建体都从一式两份的方式进行了测试。“ＮＤ”表示.“未检测”。

从图7中可以明显看出：利用能严格调控转染cDNA表达的载体，（该cDNA的表达由四环素调控的反转录蛋白因子（Gossen和Bujard，１９９２）来调控），通过编码全长受体的转染cDNA的瞬间表达，Ｐ５５－Ｒ在Hela细胞中表达量的很小的提高将导致广泛的细胞死亡。当仅仅表达Ｐ５５－ＩＣ时，可以观察到更强的细胞毒性。在Hela细胞中，当仅表达含必要的“死亡功能域”（第３２８－４２６氨基酸之间区域）的Ｐ５５－ＩＣ一个片段时，也可以观察到有意义的细胞毒性。在另一方面，如果Ｐ５５－ＩＣ的片段缺少“死亡功能域”或只含的一部分时，它们的表达对细胞的生存力没有影响（或表达荧光素酶基因，用作对照）。利用Ｐ５５－ＩＣ cDNA稳定转化的细胞，Ｐ５５－ＩＣ的细胞毒性可以得到进一步的证实；这些转化细胞在Ｐ５５－ＩＣ未被诱导表达时能持续生长，但一旦Ｐ５５－ＩＣ表达，它们就会死亡（见上）。

（ｃ）Ｐ５５－ＴＮＦ－Ｒ胞内区的其它效应

为了研究ＴＮＦ的其它活动是否能被含有“死亡功能域”的胞内区自缔合所触发；我们研究了全长受体（Ｐ５５－Ｒ）的提高表达与受体胞内

区（P55-IC）的表达对杀菌素8（IL-8）转录的影响，杀菌素8（IL-8）现在已知它可被TNF所激活（Matsushima等,1988)。结果发表于图8，图8描述了在Hela细胞中，IL-8基因表达的不依赖配基的诱导作用，该Hela细胞是利用四环素调控的构建体。用P55-R或P55-IC转染的（也见“方法与材料”和上述例1）。图8的A栏中，再现了Northern印迹法分析（见上述“方法与材料”）RNA的结果，分析用的RNA（7μg/泳道）从Hela细胞(HTta-1）中提取，用TNF(500μg/ml,4小时)处理(TNF)或不处理(对照),或来自于转染后24小时的HTta-1细胞,即用P55-IC(′ P55-IC′)P55-R(′ P55-R′)或荧光酶（′ luc'）转染的细胞（在四环素存在或不存在的情况下）。图8B栏的Northern印迹法分析结果表示的是A栏中每个样品的18SrRNA的亚甲基兰染色情况。

因而，从图8可以看出，用四环素调控的，编码P55-R的cDNA的构建物转染Hela细胞，就会诱导IL-8的转录。而用编码P55-IC的cDNA转染细胞，可以观察到更强烈的诱导作用。在上述两例中，只有当四环素从细胞生长培养基中去除以后，诱导作用才会发生，这表明，诱导是作为转染的P55-R或P55-IC表达的结果而产生。作为对照，用荧光素酶cDNA对Hela细胞进行转染，则对IL-8的转录没有影响。

因此，从上述结果看来（图8），仅仅提高P55-R的表达，或仅仅提高其胞内区（P55-IC）的表达，都是以不依赖体（TNF）的方式触发细胞毒性或其它效应，这些效应包括细胞内IL-8基因表达的增强效应。这些效应的触发很可能是由于P55-R胞内区（P55-IC）的自缔合而产生的。只如上面所提到的，似乎是，一旦P55-IC发生自缔合，其“死亡功能域”将为胞内过程的诱导提供信号，这些胞内过程将导致细胞内细胞毒性的触发，而其它一些效应，如作为诱导IL-8基因表达的信号，很可能是由于自缔合后P55-IC其它区的作用,所以很可能是P55-IC的不同区负责胞内不同的TNF诱导效应（如细胞毒性，IL-8的诱导），这些效应是P55-IC自缔合后胞内信号引发的结果。

P55-IC能以不依赖配基（TNF）的方式诱导其它胞内效应的触发，如IL-8的诱导作用，这一事实说明，P55-IC，或其特定部分可以用作特异性工具在需要处理的细胞或组织中带来这样的效果，而这些组织或细胞不必用TNF来处理。在许多病理条件下（如肿瘤），用TNF处理，尤其是高剂量处理时可能导致不理想的副作用，这些副作用是由于TNF与受体结合而系统诱导的数种胞内效应产生的。本发明发现P55-IC还能模仿特定的其它TNF诱导效应(除细胞毒性之外），如对IL-8表达的诱导，这将开创一种新方法，该方法可把P55-IC或其特定片段导入特定的细胞或组织中，并能作为信号诱导特定的理想胞内效应，如IL-8的诱导，因而克服了在TNF处理中常见的系统副作用。

（d）P55TNF-R与FAS-R（Fas/Ap01）的胞内区及其“死亡功能域”在Hela细胞中杀细胞效应的不依赖配基触发作用。

关于P55TNF-R和FAS-R的胞内区（P55IC和FAS-IC）的细胞毒性，现在得到进一步的阐述：P55-IC，它的“死亡功能域”（P55DD）及FAS-IC在Hela细胞中都具有杀细胞效应的不依赖配基触发作用。在这个研究中，Hela细胞用表达载体进行转染。这些表达载体包含有不同的构建体：含全长P55-TNF-R，包括P55IC和P55DD的片段的构建体；含FAS-IC的构建体。在其中一组试验中，Hela细胞用含P55TNF-R的构建体和含FAS-IC的构建体进行其转染（构建体的细节、制备等见上）。该研究的结果陈述于图9（A和B），其中用来转染Hela细胞的构建体以图解形式列于左侧栏中。FAS或TNF受体表达的结果以图解形式列于中间两栏内（从左数第二和第三栏），转染细胞生存力的结果列于右侧栏中。在图9A中，显示了转染的Hela细胞瞬间表达全长P55-R，P55-IC或其片段，或作为对照的荧光素酶(luc)的结果中，在这些表达中，所利用的都是四环素调控的表达载体。在图9B中，显示了转染的Hela细胞单独表达FAS-IC或同时表达P55-R及FAS-IC的结果，利用的也是四环素调控的表达载体。在图9A和B的图解结果中，开放块表示抑

制表达的四环素(1μg/ml)存在下的转染细胞，封闭块表示抑制表达的四环素不存在情况下的转染细胞。ＴＮＦ受体表达在转染后２０小时测定，一种测定方法是ＥＬＩＳＡ，即利用抗受体胞外区的抗体（见左侧栏），同时用另一种测定方法，即通过测量放射性标记的ＴＮＦ与细胞的结合量来测定 ＴＮＦ受体的表达（中间栏）。转染蛋白的杀细胞效应在转染后４８小时测定。发表的资料来自三个具有本质相同的结果的试验中的一个，在这三个试验中，每个构建体都以一式两份的形式进行了测试。图９Ａ和Ｂ中称为“ＮＤ”表示未进行检测。从图９Ａ和Ｂ中的结果明显可见，仅是Ｐ５５ＩＣ的表达会导致更强的细胞毒性。当仅表达“死亡功能域”时，也产生了有意义的细胞毒性，与之相反，缺失“死亡功能域”或只含“死亡功能域”片段的Ｐ５５ＩＣ的一些片段的表达，对细胞的生存力没有影响，ＦＡＳ－ＩＣ的表达不会导致有意义的细胞毒性，而是很有意义的增强了其表达的Ｐ５５－Ｒ的细胞毒性。

例３

能与Ｐ５５ＴＮＦ－Ｒ或ＦＡＳ－Ｒ胞内区结合的附加蛋白

用上述例中同样的方法和技术，另外三种蛋白已被分离出来并被鉴定为能与Ｐ５５ＩＣ或ＦＡＳ－ＩＣ结合。

在图１０－１２中，以图解形式发表了三种cDNA克隆的部分基本核苷酸序列，这三种cDNA克隆分别称为Ｆ２，Ｆ９和ＤＤ１１。

用鼠的ＦＡＳ－ＩＣ作“钓饵”，筛选鼠的胚胎文库，从中分离出Ｆ２克隆和Ｆ９克隆。在图１０中，以图解形式表示了已经测出序列的Ｆ２cDNA的部分核苷酸序列，图１１中以图解形式表示了来自已经测出序列的Ｆ９cDNA的含１７２４个碱基的核苷酸序列的一部分。对由Ｆ２和Ｆ９克隆编码的蛋白的结合能力分别进行分析，表明:

（ａ）Ｆ２与人Ｐ５５ＩＣ及Ｐ５５ＤＤ和鼠ＦＡＳ－ＩＣ有着强烈的相互作用，而它与相关蛋白，人ＦＡＳ－ＩＣ，及与非相关（对照）蛋白ＳＮＦ$_1$和核纤层蛋白的相互作用却很弱。

（ｂ）Ｆ９与人Ｐ５５－ＩＣ及Ｐ５５ＤＤ和鼠ＦＡＳ－ＩＣ有着强烈的相互作用，而与人ＦＡＳ－ＩＣ(相关蛋白)和非相关蛋白ＳＮＦ１和

核纤层蛋白的相互作用却很弱。

（ｃ）Ｆ２和Ｆ９都与人Ｐ７５ＩＣ、pＧＢＴ９（空白载体）或人ＣＤ－４０没有任何相互作用。

此外，从“基因库”和“蛋白库”的检索表明，Ｆ２和Ｆ９代表了两种新型蛋白。

因而，Ｆ２和Ｆ９代表对ＦＡＳ－ＩＣ和Ｐ５５ＩＣ具有结合特异性的两种新型蛋白。

用人Ｐ５５ＤＤ作“钓饵”，筛选人Hela文库，从中分离出ＤＤ１１克隆，图１２以表解形式表示了来自已知序列的DD11cDNA的含４２５个碱基的核苷酸序列的一部分。

ＤＤ１１克隆大约含８００个核苷酸。用该克隆作探针，发现其转录产物的全长约１２００个碱基。对ＤＤ１１克隆编码蛋白的结合能力进行分析，表明ＤＤ１１与Ｐ５５ＤＤ（氨基酸３２６－４１４）（见图９）有着强烈的相互作用，但与该区域的缺失突变体，如氨基酸326－404，则没有相互作用。ＤＤ１１与人和鼠的ＦＡＳ－ＩＣ能相互作用，与核纤层蛋白也有某种程度的相互作用。ＤＤ１１完全不与ＳＮＦ，也不与ｐＧＢＴ９（空的诱饵载体）相互作用。ＤＤ１１在“基因库”和“蛋白库”中都未被发现。因此，ＤＤ１１是一种能与Ｐ５５ＩＣ（Ｐ５５ＤＤ）和ＦＡＳ－ＩＣ特异结合的蛋白。

例４

可溶性二聚ＴＮＦ受体的构建

基于上述例２中的发现，Ｐ５５－Ｒ的胞内区（Ｐ５５－ＩＣ）及其片段（“死亡功能域”），Fas/APO1的胞内区及其片段（也称作“死亡功能域”）都具有自缔合能力。因此有可能构建新的ＴＮＦ受体，它们将具有自缔合（聚集）能力并是可溶性的。这样的ＴＮＦ受体应该是融合蛋白，即含必要的Ｐ５５－Ｒ的全部胞外区与含必要的Ｐ５５－Ｒ或Fas/APO1的全部胞内区或其“死亡功能域”相融合的产物。因而，这样的融合构建体将缺少Ｐ５５－Ｒ的跨膜区，所以它们是可溶的。此外，由于胞内区或其“死亡功能域”具有自缔合能力，因此，这些融合构建体将具

有寡聚能力，并至少形成P55-R的二聚体（也可能是更高级的多聚体）。结果，这些二聚TNF受体（P55-R）将能结合天然产生的TNF同源三聚体的至少两个TNF单体，并提供能与其配基（同源三聚体TNF）更好地结合的可溶性TNF受体。

因此，需要构建至少四种类型的P55TNF受体融合蛋白，每种都具有寡聚能力，且是可溶的。

(i) P55-R胞外区（EC55）与P55-R胞内区（p55-IC）构成的融合蛋白;

(ii) EC55与p55-IC的“死亡功能域”（DD55）构成的融合蛋白;

(iii) EC55与Fas/Ap01胞内区（ICAS）构成的融合蛋白；及

(iv) EC55与ICFAS的“死亡功能域”（DDFAS）构成的融合蛋白。

上述每个融合蛋白中，TNF单体的结合能力是由EC55部分产生的，而寡聚合能力（或至少为二聚合能力）由“尾区”产生，“尾区”即p55IC部分，或DD55部分，或ICFAS部分，或DDAS部分。

为了构建上述融合蛋白，需要应用重组DNA的常规技术，该技术体系现在已经很好地建立起来（见: Sambrook等，（1989）分子克隆: 实验手册，冷泉港实验出版社，冷泉港: 纽约）简言之，任何合适的细菌、噬菌体或动物病毒表达载体（为选择插入DNA表达设计的克隆载体或质粒）都可在一个或多个阶段用来插入编码EC55和其中一个“尾区”的DNA。“尾区”即p55-IC，或DD55，或ICFAS，或DDFAS。编码每个融合蛋白的插入DNA将置于克隆载体或质粒的各种表达调控序列之下，如启动子，核酶结合位点，转录因子结合位点等。表达调控序列的选择取决于选择的表达载体类型并且也就取决于宿主细胞的类型（真核细胞或原核细胞），以便本发明的融合蛋白能更好地表达。理想的宿主细胞（及载体）是真核细胞类型，尤其是哺乳动物的细胞。

按下列程序制备编码上述每个融合蛋白的ＤＮＡ分子，并把它们插入表达载体。

（ａ）首先，按照常规方法构建ＰＣＲ中所用的寡核苷酸，这些寡核苷酸表示如下：

1）ACC ATG GGC CTC TCC ACC GTG (EC55,正意义链)(SEQ ID NO:1)

2）ACGC GTC GAC TGT GGT GCC TGA GTC CTC (EC55,反意义链)(SEQ ID NO:2)

3）ACGC GTC GAC CGC TAC CAA CGG TGG AAG (IC55, 正意义链) (SEQ ID NO:3)

4）TCA TCT GAG AAG ACT GGG (IC55, 反意义链)(SEQ ID NO:4)

5）ACGC GTC GAC AAG AGA AAG GAA GTA CAG (IC FAS, 正意义链)(SEQ ID NO:5)

6）CTA GAC CAA GCT TTG GAT (IC FAS, 反意义链)(SEQ ID NO:6)

7）ACGC GTC GAC CCC GCG ACG CTG TAC GCG(DD55,正意义链)(SEQ ID NO:7)

8）ACGC GTC GAC GAT GTT GAC TTG AGT AAA (DD FAS,正意义链)(SEQ ID NO:8)

ｂ）本实验室备有含全长ｐ５５－Ｒ和Fas/Ap01受体编码克隆的质粒（参见ＥＰ５６８９２５及上述例１－３），这些质粒用来进行以下扩增，从而产生编码每一融合蛋白的ＤＮＡ片段，并把这些ＤＮＡ片段连入上述选出的表达载体中。

(i)为了合成编码作为４个融合蛋白组成部分之一的ＥＣ５５的ＤＮＡ片段，用上述寡核苷酸１和２作引物，对含人Ｐ５５cDNA的质粒进行ＰＣＲ扩增（大小约为６４０个碱基对的片段）。

(ii)为了得到融合产物ＥＣ５５－ＩＣ５５，用上述寡核苷酸３和４作引物，对含人ｐ５５cDNA的质粒进行ＰＣＲ扩增，得到一编码ＩＣ５５的ＤＮＡ片段（大小约６７７个碱基对），再把该片段与经saLI酶切的ＥＣ５５相混合，然后通过平端连接法接入在合适启动子调控下的哺乳动物细胞表达载体。载体内ＩＣ５５－ＥＣ５５的插入方向通过限制性酶切和测序技术鉴定。

(iii)为了得到融合产物ＥＣ５５－ＩＣＦＡＳ，用寡核苷酸５和６作引物对含ＦＡＳcDNA克隆的质粒进行ＰＣＲ扩增，得到编码ＩＣＦＡＳ的一个ＤＮＡ片段（大小约４４８个碱基对），再把该片段用SalI酶切并与经salI酶切的ＥＣ５５混合，接着通过平端连接法接入在合适启动子调控

下的哺乳动物细胞表达载体。载体内ＥＣ５５－ＩＣＦＡＳ的插入方向通过限制性酶切和测序技术进行鉴定。

(iv)为了得到融合产物ＥＣ５５－ＤＤ５５，用寡核苷酸７和４作引物对人Ｐ５５cDNA进行ＰＣＲ扩增，得到一带有ＤＤ５５编码序列的ＤＮＡ片段，大小约３１４个碱基对，该片用SalI酶切并与经SalI酶切的ＥＣ５５混合，接着通过平端连接法连入哺乳动物细胞表达载体。载体内ＥＣ５５－ＤＤ５５的插入方向通过限制性酶切技术和测序技术进行鉴定。

(V)为了得到融合产物ＥＣ５５－ＤＤＦＡＳ，用寡核苷酸６和８作引物对ＦＡＳcDNA克隆进行ＰＣＲ扩增，得到一含ＤＤＦＡＳ编码序列的ＤＮＡ片段，大小约３３２个碱基对，该片段用SalI酶切并与经SalI酶切的ＥＣ５５混合，接着通过平端连接法连入哺乳动物细胞表达载体。载体中ＥＣ５５－ＤＤＦＡＳ的插入方向通过限制性酶切和测序技术鉴定。

一旦上述表达载体构建结束，通过常规技术它们就可引入合适的哺乳动物细胞（如中国仓鼠卵巢细胞（CHO）或猴肾细胞（ＣＯＳ））进行表达。所表达的融合蛋白将通过常规技术纯化（参见EP308378,EP398327及EP568925)。纯化后的蛋白进行寡聚合能力的分析（及其程度分析，即它们是否形成二聚体或更高级的多聚体），同时也对它们与ＴＮＦ结合的能力（及其结合亲和性）进行了分析。

例５

可溶性二聚Fas/Ap01受体的构建

按照上述例４中的同样方式，可以合成以下四种类型的Fas/Ap01融合产物,其中每个融合蛋白都具有寡聚能力且是可溶的:

(i)Fas/Ap01胞外区（ＥＣＦＡＳ）与Ｐ５５－ＩＣ的胞内区之间构成的融合产物;

(ii)ＥＣＦＡＳ与Ｐ５５－ＩＣ的“死亡功能域”（DD55）之间构成的融合产物;

(iii)ＥＣＦＡＳ与Fas/Ap01胞内区（ＩＣＦＡＳ）之间构成的融合产物;

(iv)ＥＣＦＡＳ与ＩＣＦＡＳ的“死亡功能域”(DDFAS)之间构成的融合产物。

在上述每一融合蛋白中，ＦＡＳ配基结合能力由ＥＣＦＡＳ部分产生；而寡聚合能力（至少是二聚合能力）由“尾区”产生，“尾区”即Ｐ５５－ＩＣ，或ＤＤ５５，或ＩＣＦＡＳ，或ＤＤＦＡＳ部分中的任何一个。

编码上述融合蛋白的ＤＮＡ片段及其表达载体的构建同例４，但在这里要用不同的寡核苷酸序列（未发表）来制备ＥＣＦＡＳ片段并与上述的任一“尾区”相连。接着，将表达载体引入合适的宿主细胞，并对表达的融合蛋白进行纯化，然后分析它们的寡聚合能力（及其程度，即它们是否形成二聚体或更高级的多聚体）。同时也分析了它们与ＦＡＳ配基的结合能力（及其结合亲和性）。

例６

可溶性寡聚“混合”ＴＮＦ/ＦＡＳ受体的构建

为了制备具有“混合”亲和性的寡聚受体，即同时对ＴＮＦ和ＦＡＳ－Ｒ配基具有亲和性的受体，上述所提到的融合产物（例４和５）将应用于下列程序:

i)合成一种如例４所述的融合产物，它包含ＴＮＦ－Ｒ（Ｐ７５ＴＮＦ－Ｒ或Ｐ５５ＴＮＦ－Ｒ）的胞外区融合于Ｐ５５ＩＣ、ＦＡＳ－ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳＤＤ这四种蛋白中的任何一种。

ii)合成一种如例５所述的融合产物，它包含ＴＮＦ－Ｒ的胞外区融合于Ｐ５５ＩＣ、Ｐ５５ＤＤ、ＦＡＳ－ＩＣ、ＦＡＳ－ＤＤ这四种蛋白中的任何一种。

iii)把i)中任一融合产物与ii)中任一融合产物混合，得到一新的二聚体受体（或更高级的多聚体），该受体同时具有TNF-R和FAS-R的胞外区。这两种胞外区由－ＩＣ区或－ＤＤ区段相连。

上述程序中，i)中的融合产物和ii)中的融合产物可以分别合成，即，先从产生它们的转化细胞中纯化出来，再在体外混和，从而得到混合性的亲合受体。另外，可以用含融合产物编码序列的载体与宿主细胞共转染，

在这种情况下，可以直接从其转染的宿主细胞中得到混合的亲和性受体。融合产物实际寡聚合成为寡聚受体，可以发生在细胞中，也可以在融合产物的纯化过程中发生，或在纯化后发生，从而得到在细胞中表达的融合产物。为了准确选出混合的亲和性受体，可以应用各种常规技术，例如，应用亲和层析法，在该法中，用抗ＴＮＦ－Ｒ和ＦＡＳ－Ｒ胞外区的抗体，在连续的层析步骤中选择出同时具有两种胞外区的受体。

参考文献

1. 癌研究 (cancer Res.), 51: 5602-5607(1991).
2. 基因学 (Genomics), 16: 241-218(1993).
3. 科 学 (Science), 262: 1512-4 (1993).
4. 生物技术(Bio Techniques), 14:920-924(1993).
5. 基 因 (Gene), 66: 1-10 (1988).
6. 新英格兰医学杂志 (NEJM), 316: 379-385 (1987).
7. 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 270: 337-341 (1995).
8. 临床血液学与肿瘤学杂志 (J. Clin. Hematol. oncol.), 10: 39-48(1980).
9. 迈阿密冬季学术会议(录) (Miami wint. symp.), 19: 265-274(1982).
10. 欧洲分子生物学组织杂志 (EMBO J.), 11: 943-950 (1992).
11. 论文集: 酵母的分子生物学:生命循环与遗传 (The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life cycle and Inheritance), 冷泉港实验室, 冷泉港, 纽约, 第445-470 页(1981).
12. 细胞 (cell), 28: 203-204 (1982).
13. 美国国家科学院会议录 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 87: 3127-3131(1990).
14. 美国国家科学院会议录 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 90: 10932-6 (1993).
15. 放线菌生物学第六次国际学术会议 (Sixth International Symposium on actinomycetales Biology), 克多科学院, 布达佩斯、匈牙利, 45-54 (1986).
16. 纽约科学院年刊 (Ann N.Y. Acad. Sci.), 660: 271-3 (1992).
17. 科学 (Science), 263: 1759-1762 (1994).
18. 核酸研究 (Nucleic Acids Res) (英国), 21 (22):5251-5(1993).
19. 科学 (Science), 264: 707-709(1994).
20. 分子生物学方面的现行原始记录 (Current protocols in molecular biology) (1994), PP.8.1.1-8.1.6 和 16.7-16.7.8, Greene 出版合伙人公司及 Wiley & Sons, Inc., New York.
21. 生物化学杂志 (J.Biol. Chem.), 269: 20878-20884(1994).
22. 基因 (Gene), 128: 247-249(1993).
23. 临床实验免疫学 (Clin. Exp. Immunol.), 96: 31-35(1994).
24. 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 265: 1531-1536(1990).
25. 眼科学与视觉科学研究 (Invest. Ophthalmol.. Vis. Sci.), 32: 1534-1539(1991).
26. 自然 (Nature), 340: 245-246(1989).
27. 分析生物化学 (Anal. Biochem.), 210: 179-187 (1993).
28. 工业微生物杂志 (J. Ind. Microbiol.), 1: 277-282)1987).
29. 分子细胞生物学 (Mol. Cell Biol.). 11: 3020-3026(1991).

30. 美国国家科学会议录 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 89: 5547-5551(1992).
31. 杆菌的分子生物学 (The Molecular Biology of the Bacilli), 科学出版社, 纽约, 307-329 (1982).
32. 酶学方法 (in Methods Enzymol.), 101: 181-191(1983).
33. 国际免疫学 (Int. Immunol.), 5: 681-690 (1993).
34. 美国国家科学院会议录 (Proc. Natl. Acad. Sci, USA), 87:6151-6155(1990).
35. 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 264: 14927-14937 (1989).
36. 免疫学杂志 (J. Immunol.), 139: 1161-1167(1987).
37. 细胞 (cell), 66:233.
38. 生物化学杂志 (J. Biol. chem), 268: 10932-7(1993).
39. 日本细菌学杂志 (Jpn, J. Bacteriol.), 33: 729-742(1978).
40. 传染病评述 (Rev. Infect. Dis.), 8: 693-704 (1986).
41. 生物化学杂志 (J. Biol. chem.), 268: 24515-8(1993).
42. 细菌学杂志 (J. Bacteriol.), 169: 4177-4183(1987).
43. 自然遗传学 (Nature Genetics), 2: 180-185(1992).
44. 生物药学通报 (Biol. pharm. Bull.) (日本), 16: 879-883(1993).
45. 分子生物学方面的现行原始记录 (Current protocol in molecular Biology), (1994), PP.8.1.1-8.1.6, Greene 出版协会公司及 Wiley & Sons, Inc., New YOrk.
46. 细胞 (cell), 61: 351-359.
47. 分子克隆:实验手册 (Molecular Cloning:A laboratory Manual), (1982), 冷泉港实验室, 冷泉港.
48. 细胞生物学: 综合论文集, 第 3 套: 基因表达 (Cell Biology:A Comprehensive Treatise Vol. 3: Gene Expression), (1980), 科学出版社,纽约, 563-608.
49. 实验医学杂志(J. Exp. Med.), 167: 1883-1893(1988).
50. 欧洲分子生物学组织杂志 (EMBO J.), 9:3269-3278(1990).
51. 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 267: 10709 (1992).
52. 自然 (Nature), 364: 860-809(1993).
53. 分子细胞生物学 (Mol. Cell Biol.), 3: 280(1983).
54. 淋巴因子细胞激活素研究 (Lymphokine Cytokine Res.), 12: 309-312(1993).
55. 实验医学杂志 (J. Exp. Med.), 166: 1280-89(1987).
56. 欧洲生物化学学会联合会通讯 (FEBS Lett.), 348: 109-113(1994).
57. 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 268: 6065-6068(1993).
58. 分子克隆: 实验室手册(Molecular Cloning:A laboratory Manual) 冷泉港实验室出版社,冷泉港, 纽约.
59. 细胞 (Cell), 61: 361-370 (1990).

60. 生物化学杂志 (J. Biol. chem.), 268: 9949-54(1993).
61. 美国实验生物学会联合会杂志 (FASEB J.), 在印刷中.
62. 自然 (Nature), 365: 654-657(1993).
63. 核酸学术会议丛书 (Nucleic Acids Symp. Ser.), 29: 177-8 (1993).
64. 肿瘤基因 (Oncogene), 8: 3183-8(1993).
65. 科学 (Science), 248: 1019-1023(1990).
66. 分子生物学方面的现行原始记录 (in: Current protocols in molecular biology,) (1994), PP. 16.7.1-16.7.8, Greene 出版协会, 公司及 Wiley & Sons, Inc. New York.
67. 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.), 269: 22492-22495(1994).
68. (囊胚)套人杂志 (Embo J.), 8: 1403-1410(1989).
69. 细胞 (Cell), 74: 845-853(1993).
70. 自然 (Nature), 330: 662-664(1987).
71. 免疫学杂志 (J. Immunol.), 132: 2469-9(1984).
72. 干扰素 7 (Interferon 7) (Ion Gresser 编), PP.83-122 (1986), 科学出版社, 伦敦.
73. 细胞激活素 (Cytokine), 6: 556(1994).
74. 免疫学杂志 (J. Immunol.), 148: 1274-1279(1992).
75. 自然 (Nature), 356: 314-317(1992).
76. 细胞 (Cell), 78: 1005-1015(1994).
77. 美国国家科学院会议录 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 86:1603-1607.
78. 自然(英国) (Nature) (England), 365: 448-451.

序列表

(1) 一般信息：

(i) 申请人：
(A) 名称：耶达研究与发展有限公司
(B) 街道：P.O. Box 95
(C) 城市：Rehovot
(E) 国家：Israel
(F) 邮码 (ZIP)：76100
(G) 电话：011-972-847-0617
(H) 电传：011-972-847-0733

(A) 名称：Henry WEINWURZEL
(B) 街道：Herzl 街道 43
(C) 城市：Raanana
(E) 国家：Israel
(F) 邮码 (ZIP)：43353

(A) 名称：David WALLACH
(B) 街道：24 Borochov 街道
(C) 城市：Rehovot
(E) 国家：Israel
(F) 邮码 (ZIP)：76406

(A) 名称：Mark BOLDIN
(B) 街道：Zelenograd 927-53
(C) 城市：Moscow
(E) 国家：Russia
(F) 邮码 (ZIP)：103575

(A) 名称：Igor METT
(B) 街道：60 Levin Epstein 街道
(C) 城市：Rehovot
(E) 国家：Israel
(F) 邮码 (ZIP)：76462

(A) 名称：Eugene VARFOLOMEEV
(B) 街道：P.O. Box 26
(C) 城市：Rehovot
(E) 国家：Israel
(F) 邮码 (ZIP)：76100

(ii) 发明名称：ＴＮＦ／ＮＧＦ超家族受体和可溶性寡聚ＴＮＦ／ＮＧＦ超家族受体的调节剂

(iii) 序列数量：26

(iv) 通信地址：
(A) 收信人：BROWDY AND NEIMARK
(B) 街道：419 Seventh 街道, N.W., Suite 300
(C) 城市：Washington
(D) 洲：D.C.

(E) 国家：USA
(F) ZIP：20004

(v) 计算机可读形式：
(A) 媒介类型：软盘
(B) 计算机：IBM PC 兼容
(C) 操作系统：PC-DOS/MS-DOS
(D) 软件：PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(v) 当前申请资料：
申请号： PCT/US95/05854

(vi) 在先申请资料：
(A) 申请号：IL 109,632
(B) 申请日：11-MAY-1994

(vi) 在先申请资料：
(A) 申请号：IL 111,125
(B) 申请日：02-OCT-1994

(viii) 律师/代理人信息：
(A) 名称：BROWDY, Roger L.
(B) 注册号：25,618
(C) 参考/档案号：WALLACH=15 PCT

(ix) 电讯信息：
(A) 电话：202-628-5197
(B) 电传：202-737-3528
(C) 电报：248633

(2) SEQ ID NO：1 信息：

(i) 序列特征：
(A) 长度：21 bp
(B) 类型：核酸
(C) 链型：单链
(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子 类型：cDNA

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：1：

ACCATGGGCC TCTCCACCGT G 21

(2) 信息 SEQ ID NO：2：

(i) 序列特征：
(A) 长度：28 bp
(B) 类型：核酸
(C) 链型：单链
(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子 类型：cDNA

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：2：

ACGCGTCGAC TGTGGTGCCT GAGTCCTC 28

(2) 信息 SEQ ID NO：3：

(i) 序列特征：
(A) 长度：28 bp
(B) 类型：核酸
(C) 链型：单链
(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子 类型：cDNA

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：3：

ACGCGTCGAC CGCTACCAAC GGTGGAAG 28

(2) 信息 SEQ ID NO：4：

(i) 序列特征：
(A) 长度：18 bp
(B) 类型：核酸
(C) 链型：单链
(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子 类型：cDNA

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：4：

TCATCTGAGA AGACTGGG 18

(2) 信息 SEQ ID NO：5：

(i) 序列特征：
(A) 长度：28 bp
(B) 类型：核酸
(C) 链型：单链
(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子 类型：cDNA

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：5：

ACGCGTCGAC AAGAGAAAGG AAGTACAG 28

(2) 信息 SEQ ID NO：6：

(i) 序列特征：

(A) 长度: 18 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子 类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6:

CTAGACCAAG CTTTGGAT 18

(2) 信息 SEQ ID NO: 7:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 28 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子 类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 7:

ACGCGTCGAC CCCGCGACGC TGTACGCC 28

(2) 信息 SEQ ID NO: 8:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 28 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子 类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 8:

ACGCGTCGAC GATGTTGACT TGAGTAAA 28

(2) 信息 SEQ ID NO: 9:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 2866 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子 类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 9:

ATTCGGGTGC AGCCCCAGCA GTCTCCAGCG GCGGCCCCCG GCGGCACGGA CGAGAAGCCG 60

AGCGGCAAGG AGCGGCGGGA TGCCGGGGAC AAGGACAAAG AACAGGAGCT GTCTGAAGAG 120

GATAAACAGC TTCAAGATGA ACTGGAGATG CTCGTGGAAC GACTAGGGGA GAAGGATACA 180

TCCCTGTATC GACCAGCGCT GGAGGAATTG CGAAGGCAGA TTCGTTCTTC TACAACTTCC 240

ATGACTTCAG TGCCCAAGCC TCTCAAATTT CTGCGTCCAC ACTATGGCAA ACTGAAGGAA 300

ATCTATGAGA ACATGGCCCC TGGGGAGAAT AAGCGTTTTG CTGCTGACAT CATCTCCGTT 360

TTGGCCATGA CCATGAGTGG GGAGCGTGAG TGCCTCAAGT ATCGGCTAGT GGGCTCCCAG 420

GAGGAATTGG CATCATGGGG TCATGAGTAT GTCAGGCATC TGGCAGGAGA AGTGGCTAAG 480

GAGTGGCAGG AGCTGGATGA CGCAGAGAAG GTCCAGCGGG AGCCTCTGCT CACTCTGGTG 540

AAGGAAATCG TCCCCTATAA CATGGCCCAC AATGCAGAGC ATGAGGCTTG CGACCTGCTT 600

ATGGAAATTG AGCAGGTGGA CATGCTGGAG AAGGACATTG ATGAAAATGC ATATGCAAAG 660

GTCTGCCTTT ATCTCACCAG TTGTGTGAAT TACGTGCCTG AGCCTGAGAA CTCAGCCCTA 720

CTGCGTTGTG CCCTGGGTGT GTTCCGAAAG TTTACCCGCT TCCCTGAAGC TCTGAGATTG 780

GCATTGATGC TCAATGACAT GGAGTTGGTA GAAGACATCT TCACCTCCTG CAAGGATGTG 840

GTAGTACAGA AACAGATGGC ATTCATGCTA GGCCGGCATG GGGTGTTCCT GGAGCTGAGT 900

GAAGATGTCG AGGAGTATGA GGACCTGACA GAGATCATGT CCAATGTACA GCTCAACAGC 960

AACTTCTTGG CCTTAGCTCG GGAGCTGGAC ATCATGGAGC CCAAGGTGCC TGATGACATC 1020

TACAAAACCC ACCTAGAGAA CAACAGGTTT GGGGGCAGTG GCTCTCAGGT GGACTCTGCC 1080

CGCATGAACC TGGCCTCCTC TTTTGTGAAT GGCTTYGTGA ATGCAGCTTT TGGCCAAGAC 1140

AAGCTGCTAA CAGATGATGG CAACAAATGG CTTTACAAGA ACAAGGACCA CGGAATGTTG 1200

AGTGCAGCTG CATCTCTTGG GATGATTCTG CTGTGGGATG TGGATGGTGG CCTCACCCAG 1260

ATTGACAAGT ACCTGTACTC CTCTGAGGAC TACATTAAGT CAGGAGCTCT TCTTGCCTGT 1320

GGCATAGTGA ACTCTGGGGT CCGGAATGAG TGTGACCCTG CTCTGGCACT GCTCTCAGAC 1380

TATGTTCTCC ACAACAGCAA CACCATGAGA CTTGGTTCCA TCTTTGGGCT AGGCTTGGCT 1440

TATGCTGGCT CAAATCGTGA AGATGTCCTA ACACTGCTGC TGCCTGTGAT GGGAGATTCA 1500

AAGTCCAGCA TGGAGGTGGC AGGTGTCACA GCTTTAGCCT GTGGAATGAT AGCAGTAGGG 1560

TCCTGCAATG GAGATGTAAC TTCCACTATC CTTCAGACCA TCATGGAGAA GTCAGAGACT 1620

GAGCTCAAGG ATACTTATGC TCGTTGGCTT CCTCTTGGAC TGGGTCTCAA CCACCTGGGG 1680

AAGGGTGAGG CCATCGAGGC AATCCTGGCT GCACTGGAGG TTGTGTCAGA GCCATTCCGC 1740

AGTTTTGCCA ACACACTGGT GGATGTGTGT GCATATGCAG GCTCTGGGAA TGTGCTGAAG 1800

GTGCAGCAGC TGCTCCACAT TTGTAGCGAA CACTTTGACT CCAAAGAGAA GGAGGAAGAC 1860

AAAGACAAGA AGGAAAAGAA AGACAAGGAC AAGAAGGAAG CCCCTGCTGA CATGGGAGCA 1920

CATCAGGGAG TGGCTGTTCT GGGGATTGCC CTTATTGCTA TGGGGGAGGA GATTGGTGCA 1980

GAGATGGCAT TACGAACCTT TGGCCACTTG CTGAGATATG GGGAGCCTAC ACTCCGGAGG 2040

GCTGTACCTT TAGCACTGGC CCTCATCTCT GTTTCAAATC CACGACTCAA CATCCTGGAT 2100

ACCCTAAGCA AATTCTCTCA TGATGCTGAT CCAGAAGTTT CCTATAACTC CATTTTTGCC 2160

ATGGGCATGG TGGGCAGTGG TACCAATAAT GCCCGTCTGG CTGCAATGCT GCGCCAGTTA 2220

GCTCAATATC ATGCCAAGGA CCCAAACAAC CTCTTCATGG TGCGCTTGGC ACAGGGCCTG 2280

ACACATTTAG GGAAGGGCAC CCTTACCCTC TGCCCCTACC ACAGCGACCG GCAGCTTATG 2340

AGCCAGGTGG CCGTGGCTGG ACTGCTCACT GTGCTTGTCT CTTTCCTGGA TGTTCGAAAC 2400

ATTATTCTAG GCAAATCACA CTATGTATTG TATGGGCTGG TGGCTGCCAT GCAGCCCCGA 2460

ATGCTGGTTA CGTTTGATGA GGAGCTGCGG CCATTGCCAG TGTCTGTCCG TGTGGGCCAG 2520

GCAGTGGATG TGGTGGGCCA GGCTGGCAAG CCGAAGACTA TCACAGGGTT CCAGACGCAT 2580

ACAACCCCAG TGTTGTTGGC CCACGGGGAA CGGGCAGAAT TGGCCACTGA GGAGTTTCTT 2640

CCTGTTACCC CCATTCTGGA AGGTTTTGTT ATCTTCGGAA GAACCCCAAT TATGATCTCT 2700

AAGTGACCAC CAGGGGCTCT GAACTGCAGC TGATGTTATC AGCAGGACAT GCATCCTGCT 2760

GCCAAGGGTG GACACGGCTG CAGACTTCTG GGGGAATTGT CGCCTCCTGC TCTTTTGTTA 2820

CTGAGTGAGA TAAGGTTGTT CAATAAAGAC TTTTATCCCC AAGGTC 2866

(2) 信息SEQ ID NO: 10:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 676 bp

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子 类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 10:

GAATTCGGCA CGAGCGGCAC GAGGACAGAG TGAGACTCTG TCTCTTAAAA TAATAATAAA 60

AATAAAAATA AAATGTGGGG CCGGGCAAGG TGGCTCATGC CTGTAATCCC AGCACCTTGG 120

GAGGCTGAGG CAGGAGGATT GCCTAAGCCC AGGAGTTTGA CATCAGCCTG GGCAACATGG 180

TGAAACCCCA TCTCTACAAA AAATGCAAAA ATTAGCCAGG TGTGGTGGGT GTGCTCCTAT 240

AGTCTCAGCT ACTCAGGAGG CTGAGGTAGA GGGGATCACC TGAGCCCAGG AAGTTTGGAG 300

GCTATAGTGA GCTGAAGACC CGCACCATTG CACGCCAGCC TGGAGCAAGA GACNCTGTCT 360

CCACATAAAT AAATAAATAA ATAAAAGTGG GGAACTTCTG TGTTAAGTCA GAAGGCACCA 420

CACAATTTGN ATAGCCANCA ACCATATTCA ATACCCAATC TCTTTATTGC AATATAAGTA 480

TTTGTAAACC CCTACACAAA TATTCCCAAG AATAAGTTGG AATATAAATT ACTATATCAA 540

TCANCCAATA AAAATAAACA CATACAGTAT TTATTTCCTG TTGCTCCATA TAAAGCTTTG 600

CTATTTCAAT ATAAAGCTTA CCTAGTATGG TCATTTGAGC CTGAGCAGAG AATATGCCCA 660

AGCTCGTGCC GAATTC 676

(2) 信息 SEQ ID NO: 11:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 1153 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子 类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 11:

GGCGNTCTGA CTCTCTACTG AACCAAGACT GAATCAGAGA GACTCGAGTG CNCTTATTTG 60

ATTAANCCCA AATTATTGAA ACCTNTGATT TTTTCTGGAG GNGGATGATA AAGATGTGAA 120

AGTGTGATGA ACAGTGTGTA TCCCTACTCT TGATCCTGGA ACCAGACAAG CAAGAAGCTT 180

TGATTGAAAG CCTATGTGAA AAGCTGGTCA AATTTCGCGA AGGTGAACGC CCGTCTCTGA 240

GACTGCAGTT GTTAAGCAAC CTTTTCCACG GGATGGATAA GAATACTCCT GTAAGATACA 300

CAGTGTATTG CAGCCTTATT AAAGTGGCAG CATCTTGTGG GGCCATCCAG TACATCCCAA 360

CTGAGCTGGA TCAAGTTAGA AAATGGATTT CTGACTGGAA TCTCACCACT GAAAAAAAGC 420

ACACCCTTTT AAGACTACTT TATGAGGCAC TTGTGGATTG TAAGAAGAGT GATGCTGCTT 480

CAAAAGTCAT GGTGGAATTG CTCGGAAGTT ACACAGAGGA CAATGCTTCC CAGGCTCGAG 540

TTGATGCCCA CAGGTGTATT GTACGAGCAT TGAAAGATCC AAATGCATTT CTTTGTGACC 600

ACCTTCTTAC TTTAAAACCA GTCAAGTTTG TGGAAGGCGA GCTTATTCAT GATCTTTTAA 660

CCATTTGTGT GAGTGCTAAA TTGGCATCAT ATGTCAAGTT TTATCAGAAT AATAAAGACT 720

TCATTGATTC ACTTGGCCTG TTACATGAAC AGAATATGGC AAAAATGAGA CTACTTACTT 780

TTATGGGAAT GGCAGTAGAA AATAAGGAAA TTTCTTTTGA CACAATGCAG CAAGAACTTC 840

AGATTGGAGC TGATGATGTT GAAGCATTTG TTATTGACGC CGTAAGAACT AAAATGGTCT 900

ACTGCAAAAT TGATCAGACC CAGAGAAAAG TAGTTGTCAG TCATAGCACA CATCGGACAT 960

TTGGAAAACA GCAGTGGCAA CAACTGTATG ACACACTTAA TGCCTGGAAA CAAAATCTGA 1020

ACAAAGTGAA AAACAGCCTT TTGAGTCTTT CTGATACCTG AGTTTTTATG CTTATAATTT 1080

TTGTTCTTTG AAAAAAAAGC CCTAAATCAT AGTAAAACAT TATAAACTAA AAAAAAAAAA 1140

AAAAAAACTC GAG 1153

(2) 信息 SEQ ID NO: 12:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 220 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子 类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 12:

GTCCGGTTTA CTTTAACTTA GTTTTGCATA GTTCTAGTGC ACGTGAAATT GAAAAGTTAT 60

TTCCCTTTAG CTGTGTTATT ATAGAGCAGA AATTCTGTTT TTAAAAATTA GCCTAAGATA 120

TACTTGTTTT TGTAAAGAAA AATATTTAAT GCTTGAACAA AATAAATTGG AGTTGGAGTA 180

GAATGTAGTT TGAGGAAATT TGCAGCTTCC AATGCCTCTG 220

(2) 信息 SEQ ID NO: 13:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 220 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子 类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 13:

CAGAGGCATT GGAAGCTGCA AATTTCCTCA AACTACATTC TACTCCAACT CCAATTTATT 60

TTGTTCAAGC ATTAAATATT TTTCTTTACA AAAACAAGTA TATCTTAGGC TAATTTTTAA 120

AAACAGAATT TCTGCTCTAT AATAACACAG CTAAAGGGAA ATAACTTTTC AATTTCACGT 180

GCACTAGAAC TATGCAAAAC TAAGTTAAAG TAAACCGGAC 220

(2) 信息 SEQ ID NO: 14:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 900 AA
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学：线性

(ii) 分子 类型：蛋白质

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：14：

```
Arg Val Gln Pro Gln Gln Ser Pro Ala Ala Ala Pro Gly Gly Thr Asp
1               5                  10                  15

Glu Lys Pro Ser Gly Lys Glu Arg Arg Asp Ala Gly Asp Lys Asp Lys
            20                  25                  30

Glu Gln Glu Leu Ser Glu Glu Asp Lys Gln Leu Gln Asp Glu Leu Glu
        35                  40                  45

Met Leu Val Glu Arg Leu Gly Glu Lys Asp Thr Ser Leu Tyr Arg Pro
    50                  55                  60

Ala Leu Glu Glu Leu Arg Arg Gln Ile Arg Ser Ser Thr Thr Ser Met
65                  70                  75                  80

Thr Ser Val Pro Lys Pro Leu Lys Phe Leu Arg Pro His Tyr Gly Lys
                85                  90                  95

Leu Lys Glu Ile Tyr Glu Asn Met Ala Pro Gly Glu Asn Lys Arg Phe
            100                 105                 110

Ala Ala Asp Ile Ile Ser Val Leu Ala Met Thr Met Ser Gly Glu Arg
        115                 120                 125

Glu Cys Leu Lys Tyr Arg Leu Val Gly Ser Gln Glu Glu Leu Ala Ser
    130                 135                 140

Trp Gly His Glu Tyr Val Arg His Leu Ala Gly Glu Val Ala Lys Glu
145                 150                 155                 160

Trp Gln Glu Leu Asp Asp Ala Glu Lys Val Gln Arg Glu Pro Leu Leu
                165                 170                 175

Thr Leu Val Lys Glu Ile Val Pro Tyr Asn Met Ala His Asn Ala Glu
            180                 185                 190

His Glu Ala Cys Asp Leu Leu Met Glu Ile Glu Gln Val Asp Met Leu
        195                 200                 205

Glu Lys Asp Ile Asp Glu Asn Ala Tyr Ala Lys Val Cys Leu Tyr Leu
    210                 215                 220

Thr Ser Cys Val Asn Tyr Val Pro Glu Pro Glu Asn Ser Ala Leu Leu
225                 230                 235                 240

Arg Cys Ala Leu Gly Val Phe Arg Lys Phe Thr Arg Phe Pro Glu Ala
                245                 250                 255

Leu Arg Leu Ala Leu Met Leu Asn Asp Met Glu Leu Val Glu Asp Ile
            260                 265                 270

Phe Thr Ser Cys Lys Asp Val Val Val Gln Lys Gln Met Ala Phe Met
        275                 280                 285
```

```
Leu Gly Arg His Gly Val Phe Leu Glu Leu Ser Glu Asp Val Glu Glu
    290                 295                 300

Tyr Glu Asp Leu Thr Glu Ile Met Ser Asn Val Gln Leu Asn Ser Asn
305                 310                 315                 320

Phe Leu Ala Leu Ala Arg Glu Leu Asp Ile Met Glu Pro Lys Val Pro
                325                 330                 335

Asp Asp Ile Tyr Lys Thr His Leu Glu Asn Asn Arg Phe Gly Gly Ser
            340                 345                 350

Gly Ser Gln Val Asp Ser Ala Arg Met Asn Leu Ala Ser Ser Phe Val
        355                 360                 365

Asn Gly Phe Val Asn Ala Ala Phe Gly Gln Asp Lys Leu Leu Thr Asp
    370                 375                 380

Asp Gly Asn Lys Trp Leu Tyr Lys Asn Lys Asp His Gly Met Leu Ser
385                 390                 395                 400

Ala Ala Ala Ser Leu Gly Met Ile Leu Leu Trp Asp Val Asp Gly Gly
                405                 410                 415


Leu Thr Gln Ile Asp Lys Tyr Leu Tyr Ser Ser Glu Asp Tyr Ile Lys
            420                 425                 430

Ser Gly Ala Leu Leu Ala Cys Gly Ile Val Asn Ser Gly Val Arg Asn
        435                 440                 445

Glu Cys Asp Pro Ala Leu Ala Leu Leu Ser Asp Tyr Val Leu His Asn
    450                 455                 460

Ser Asn Thr Met Arg Leu Gly Ser Ile Phe Gly Leu Gly Leu Ala Tyr
465                 470                 475                 480

Ala Gly Ser Asn Arg Glu Asp Val Leu Thr Leu Leu Leu Pro Val Met
                485                 490                 495

Gly Asp Ser Lys Ser Ser Met Glu Val Ala Gly Val Thr Ala Leu Ala
            500                 505                 510

Cys Gly Met Ile Ala Val Gly Ser Cys Asn Gly Asp Val Thr Ser Thr
        515                 520                 525

Ile Leu Gln Thr Ile Met Glu Lys Ser Glu Thr Glu Leu Lys Asp Thr
    530                 535                 540

Tyr Ala Arg Trp Leu Pro Leu Gly Leu Gly Leu Asn His Leu Gly Lys
545                 550                 555                 560

Gly Glu Ala Ile Glu Ala Ile Leu Ala Ala Leu Glu Val Val Ser Glu
                565                 570                 575

Pro Phe Arg Ser Phe Ala Asn Thr Leu Val Asp Val Cys Ala Tyr Ala
            580                 585                 590

Gly Ser Gly Asn Val Leu Lys Val Gln Gln Leu Leu His Ile Cys Ser
```

595 600 605

Glu His Phe Asp Ser Lys Glu Lys Glu Glu Asp Lys Asp Lys Lys Glu
610 615 620

Lys Lys Asp Lys Asp Lys Lys Glu Ala Pro Ala Asp Met Gly Ala His
625 630 635 640

Gln Gly Val Ala Val Leu Gly Ile Ala Leu Ile Ala Met Gly Glu Glu
645 650 655

Ile Gly Ala Glu Met Ala Leu Arg Thr Phe Gly His Leu Leu Arg Tyr
660 665 670

Gly Glu Pro Thr Leu Arg Arg Ala Val Pro Leu Ala Leu Ala Leu Ile
675 680 685

Ser Val Ser Asn Pro Arg Leu Asn Ile Leu Asp Thr Leu Ser Lys Phe
690 695 700

Ser His Asp Ala Asp Pro Glu Val Ser Tyr Asn Ser Ile Phe Ala Met
705 710 715 720

Gly Met Val Gly Ser Gly Thr Asn Asn Ala Arg Leu Ala Ala Met Leu
725 730 735

Arg Gln Leu Ala Gln Tyr His Ala Lys Asp Pro Asn Asn Leu Phe Met
740 745 750

Val Arg Leu Ala Gln Gly Leu Thr His Leu Gly Lys Gly Thr Leu Thr
755 760 765

Leu Cys Pro Tyr His Ser Asp Arg Gln Leu Met Ser Gln Val Ala Val
770 775 780

Ala Gly Leu Leu Thr Val Leu Val Ser Phe Leu Asp Val Arg Asn Ile
785 790 795 800

Ile Leu Gly Lys Ser His Tyr Val Leu Tyr Gly Leu Val Ala Ala Met
805 810 815

Gln Pro Arg Met Leu Val Thr Phe Asp Glu Glu Leu Arg Pro Leu Pro
820 825 830

Val Ser Val Arg Val Gly Gln Ala Val Asp Val Val Gly Gln Ala Gly
835 840 845

Lys Pro Lys Thr Ile Thr Gly Phe Gln Thr His Thr Thr Pro Val Leu
850 855 860

Leu Ala His Gly Glu Arg Ala Glu Leu Ala Thr Glu Glu Phe Leu Pro
865 870 875 880

Val Thr Pro Ile Leu Glu Gly Phe Val Ile Phe Gly Arg Thr Pro Ile
885 890 895

Met Ile Ser Lys
900

(2) 信息 SEQ ID NO: 15:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 995 AA
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子 类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 15:

```
Lys Lys Met Val Asp Glu Ser Asp Lys Lys Gln Gln Thr Ile Asp Glu
1               5                  10                  15

Gln Ser Gln Ile Ser Pro Glu Lys Gln Thr Pro Asn Lys Lys Asp Lys
            20                  25                  30

Lys Lys Glu Glu Glu Glu Gln Leu Ser Glu Glu Asp Ala Lys Leu Lys
        35                  40                  45

Thr Asp Leu Glu Leu Leu Val Glu Arg Leu Lys Glu Asp Asp Ser Ser
    50                  55                  60

Leu Tyr Glu Ala Ser Leu Asn Ala Leu Lys Glu Ser Ile Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

Thr Ser Ser Met Thr Ala Val Pro Lys Pro Leu Lys Phe Leu Arg Pro
                85                  90                  95

Thr Tyr Pro Asp Leu Cys Ser Ile Tyr Asp Lys Trp Thr Asp Pro Asn
            100                 105                 110

Leu Lys Ser Ser Leu Ala Asp Val Leu Ser Ile Leu Ala Met Thr Tyr
        115                 120                 125

Ser Glu Asn Gly Lys His Asp Ser Leu Arg Tyr Arg Leu Leu Ser Asp
    130                 135                 140

Val Ser Asp Phe Glu Gly Trp Gly His Glu Tyr Ile Arg His Leu Ala
145                 150                 155                 160

Leu Glu Ile Gly Glu Val Tyr Asn Asp Gln Val Glu Lys Asp Ala Glu
                165                 170                 175

Asp Glu Thr Ser Ser Asp Gly Ser Lys Ser Asp Gly Ser Ala Ala Thr
            180                 185                 190

Ser Gly Phe Glu Phe Ser Lys Glu Asp Thr Leu Arg Leu Cys Leu Asp
        195                 200                 205

Ile Val Pro Tyr Phe Leu Lys His Asn Gly Glu Glu Asp Ala Val Asp
    210                 215                 220

Leu Leu Leu Glu Ile Glu Ser Ile Asp Lys Leu Pro Gln Phe Val Asp
225                 230                 235                 240
```

```
Glu Asn Thr Phe Gln Arg Val Cys Gln Tyr Met Val Ala Cys Val Pro
                245                 250                 255

Leu Leu Pro Pro Pro Glu Asp Val Ala Phe Leu Lys Thr Ala Tyr Ser
            260                 265                 270

Ile Tyr Leu Ser Gln Asn Glu Leu Thr Asp Ala Ile Ala Leu Ala Val
        275                 280                 285

Arg Leu Gly Glu Glu Asp Met Ile Arg Ser Val Phe Asp Ala Thr Ser
    290                 295                 300

Asp Pro Val Met His Lys Gln Leu Ala Tyr Ile Leu Ala Ala Gln Lys
305                 310                 315                 320

Thr Ser Phe Glu Tyr Glu Gly Val Gln Asp Ile Ile Gly Asn Gly Lys
                325                 330                 335

Leu Ser Glu His Phe Leu Tyr Leu Ala Lys Glu Leu Asn Leu Thr Gly
            340                 345                 350

Pro Lys Val Pro Glu Asp Ile Tyr Lys Ser His Leu Asp Asn Ser Lys
        355                 360                 365

Ser Val Phe Ser Ser Ala Gly Leu Asp Ser Ala Gln Gln Asn Leu Ala
    370                 375                 380

Ser Ser Phe Val Asn Gly Phe Leu Asn Leu Gly Tyr Cys Asn Asp Lys
385                 390                 395                 400

Leu Ile Val Asp Asn Asp Asn Trp Val Tyr Lys Thr Lys Gly Asp Gly
                405                 410                 415

Met Thr Ser Ala Val Ala Ser Ile Gly Ser Ile Tyr Gln Trp Asn Leu
            420                 425                 430

Asp Gly Leu Gln Gln Leu Asp Lys Tyr Leu Tyr Val Asp Glu Pro Glu
        435                 440                 445

Val Lys Ala Gly Ala Leu Leu Gly Ile Gly Ile Ser Ala Ser Gly Val
    450                 455                 460

His Asp Gly Glu Val Glu Pro Ala Leu Leu Leu Leu Gln Asp Tyr Val
465                 470                 475                 480

Thr Asn Pro Asp Thr Lys Ile Ser Ser Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly
                485                 490                 495


Ile Ala Phe Ala Gly Ser Lys Asn Asp Glu Val Leu Gly Leu Leu Leu
            500                 505                 510

Pro Ile Ala Ala Ser Thr Asp Leu Pro Ile Glu Thr Ala Ala Met Ala
        515                 520                 525

Ser Leu Ala Leu Ala His Val Phe Val Gly Thr Cys Asn Gly Asp Ile
    530                 535                 540

Thr Thr Ser Ile Met Asp Asn Phe Leu Glu Arg Thr Ala Ile Glu Leu
545                 550                 555                 560
```

```
Lys Thr Asp Trp Val Arg Phe Leu Ala Leu Ala Leu Gly Ile Leu Tyr
                565                 570                 575

Met Gly Gln Gly Glu Gln Val Asp Asp Val Leu Glu Thr Ile Ser Ala
            580                 585                 590

Ile Glu His Pro Met Thr Ser Ala Ile Glu Val Leu Val Gly Ser Cys
        595                 600                 605

Ala Tyr Thr Gly Thr Gly Asp Val Leu Leu Ile Gln Asp Leu Leu His
    610                 615                 620

Arg Leu Thr Pro Lys Asn Val Lys Gly Glu Glu Asp Ala Asp Glu Glu
625                 630                 635                 640

Glu Thr Ala Glu Gly Gln Thr Asn Ser Ile Ser Asp Phe Leu Gly Glu
                645                 650                 655

Gln Val Asn Glu Pro Thr Lys Asn Glu Glu Ala Glu Ile Glu Val Asp
            660                 665                 670

Glu Met Glu Val Asp Ala Glu Gly Glu Glu Val Glu Val Lys Ala Glu
        675                 680                 685

Ile Thr Glu Lys Lys Asn Gly Glu Ser Leu Glu Gly Glu Glu Ile Lys
    690                 695                 700

Ser Glu Glu Lys Lys Gly Lys Ser Ser Asp Lys Asp Ala Thr Thr Asp
705                 710                 715                 720

Gly Lys Asn Asp Asp Glu Glu Glu Glu Lys Glu Ala Gly Ile Val Asp
                725                 730                 735

Glu Leu Ala Tyr Ala Val Leu Gly Ile Ala Leu Ile Ala Leu Gly Glu
            740                 745                 750

Asp Ile Gly Lys Glu Met Ser Leu Arg His Phe Gly His Leu Met His
        755                 760                 765

Tyr Gly Asn Glu His Ile Arg Arg Met Val Pro Leu Ala Met Gly Ile
    770                 775                 780

Val Ser Val Ser Asp Pro Gln Met Lys Val Phe Asp Thr Leu Thr Arg
785                 790                 795                 800

Phe Ser His Asp Ala Asp Leu Glu Val Ser Met Asn Ser Ile Phe Ala
                805                 810                 815

Met Gly Leu Cys Gly Ala Gly Thr Asn Asn Ala Arg Leu Ala Gln Leu
            820                 825                 830

Leu Arg Gln Leu Ala Ser Tyr Tyr Ser Arg Glu Gln Asp Ala Leu Phe
        835                 840                 845


Ile Thr Arg Leu Ala Gln Gly Leu Leu His Leu Gly Lys Gly Thr Met
    850                 855                 860

Thr Met Asp Val Phe Asn Asp Ala His Val Leu Asn Lys Val Thr Leu
```

865 870 875 880

Ala Ser Ile Leu Thr Thr Ala Val Gly Leu Val Ser Pro Ser Phe Met
885 890 895

Leu Lys His His Gln Leu Phe Tyr Met Leu Asn Ala Gly Ile Arg Pro
900 905 910

Lys Phe Ile Leu Ala Leu Asn Asp Glu Gly Glu Pro Ile Lys Val Asn
915 920 925

Val Arg Val Gly Gln Ala Val Glu Thr Val Gly Gln Ala Gly Arg Pro
930 935 940

Lys Lys Ile Thr Gly Trp Ile Thr Gln Ser Thr Pro Val Leu Leu Asn
945 950 955 960

His Gly Glu Arg Ala Glu Leu Glu Thr Asp Glu Tyr Ile Ser Tyr Thr
965 970 975

Ser His Ile Glu Gly Val Val Ile Leu Lys Lys Asn Pro Asp Tyr Arg
980 985 990

Glu Glu Glu
995

(2) 信息 SEQ ID NO: 16:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 945 AA
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子 类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 16:

Met Ser Leu Thr Thr Ala Ala Pro Leu Leu Ala Leu Leu Arg Glu Asn
1 5 10 15

Gln Asp Ser Val Lys Thr Tyr Ala Leu Glu Ser Ile Asn Asn Val Val
20 25 30

Asp Gln Leu Trp Ser Glu Ile Ser Asn Glu Leu Pro Asp Ile Glu Ala
35 40 45

Leu Tyr Asp Asp Asp Thr Phe Ser Asp Arg Glu Met Ala Ala Leu Ile
50 55 60

Ala Ser Lys Val Tyr Tyr Asn Leu Gly Glu Tyr Glu Ser Ala Val Lys
65 70 75 80

Tyr Ala Leu Ala Ala Lys Asp Arg Phe Asp Ile Asp Glu Lys Ser Gln
85 90 95

Phe Val Glu Thr Ile Val Ser Lys Ser Ile Glu Met Tyr Val Gln Glu
100 105 110

```
Ala Ser Lys Gln Tyr Thr Lys Asp Glu Gln Phe Tyr Thr Lys Asp Ile
        115                 120                 125

Ile Asp Pro Lys Leu Thr Ser Ile Phe Glu Arg Met Ile Glu Lys Cys
    130                 135                 140

Leu Lys Ala Ser Glu Leu Lys Leu Ala Leu Gly Ile Ala Leu Glu Gly
145                 150                 155                 160

Tyr Arg Leu Asp Ile Ile Glu Ser Ala Leu Lys Ser Lys Leu Asp Gln
                165                 170                 175

Asp Ser Thr Ser Glu Asn Val Lys Ile Ile Asn Tyr Leu Leu Thr Leu
            180                 185                 190

Ala Ile Thr Thr Val Thr Asn Ser Lys Phe Arg Ser Ser Ile Leu Arg
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asp Phe Leu Met Asn Met Pro Asn Cys Asp Tyr Leu Thr
    210                 215                 220

Leu Asn Lys Val Val Val Asn Leu Asn Asp Ala Gly Leu Ala Leu Gln
225                 230                 235                 240

Leu Phe Lys Lys Leu Lys Glu Glu Asn Asp Glu Gly Leu Ser Ala Gln
                245                 250                 255

Ile Ala Phe Asp Leu Val Ser Ser Ala Ser Gln Gln Leu Leu Glu Ile
            260                 265                 270

Leu Val Thr Glu Leu Thr Ala Gln Gly Tyr Asp Pro Ala Leu Leu Asn
        275                 280                 285

Ile Leu Ser Gly Leu Pro Thr Cys Asp Tyr Tyr Asn Thr Phe Leu Leu
    290                 295                 300

Asn Asn Lys Asn Ile Asp Ile Gly Leu Leu Asn Lys Ser Lys Ser Ser
305                 310                 315                 320

Leu Asp Gly Lys Phe Ser Leu Phe His Thr Ala Val Arg Leu Ala Asn
                325                 330                 335

Gly Phe Met His Ala Gly Thr Thr Asp Asn Ser Phe Ile Lys Ala Asn
            340                 345                 350

Leu Pro Trp Leu Gly Lys Ala Gln Asn Trp Ala Lys Phe Thr Ala Thr
        355                 360                 365

Ala Ser Leu Gly Val Ile His Lys Gly Asn Leu Leu Glu Gly Lys Lys
    370                 375                 380

Val Met Ala Pro Tyr Leu Pro Gly Ser Arg Ala Ser Ser Arg Phe Ile
385                 390                 395                 400

Lys Gly Gly Ser Leu Tyr Gly Leu Gly Leu Ile Tyr Ala Gly Phe Gly
                405                 410                 415

Arg Asp Thr Thr Asp Tyr Leu Lys Asn Ile Ile Val Glu Asn Ser Gly
            420                 425                 430
```

```
Thr Ser Gly Asp Glu Asp Val Asp Val Leu Leu His Gly Ala Ser Leu
        435                 440                 445

Gly Ile Gly Leu Ala Ala Met Gly Ser Ala Asn Ile Glu Val Tyr Glu
    450                 455                 460

Ala Leu Lys Glu Val Leu Tyr Asn Asp Ser Ala Thr Ser Gly Glu Ala
465                 470                 475                 480

Ala Ala Leu Gly Met Gly Leu Cys Met Leu Gly Thr Gly Lys Pro Glu
                485                 490                 495

Ala Ile His Asp Met Phe Thr Tyr Ser Gln Glu Thr Gln His Gly Asn
            500                 505                 510

Ile Thr Arg Gly Leu Ala Val Gly Leu Ala Leu Ile Asn Tyr Gly Arg
        515                 520                 525

Gln Glu Leu Ala Asp Asp Leu Ile Thr Lys Met Leu Ala Ser Asp Glu
    530                 535                 540

Ser Leu Leu Arg Tyr Gly Gly Ala Phe Thr Ile Ala Leu Ala Tyr Ala
545                 550                 555                 560

Gly Thr Gly Asn Asn Ser Ala Val Lys Arg Leu Leu His Val Ala Val
                565                 570                 575

Ser Asp Ser Asn Asp Asp Val Arg Arg Ala Ala Val Ile Ala Leu Gly
            580                 585                 590

Phe Val Leu Leu Arg Asp Tyr Thr Thr Val Pro Arg Ile Val Gln Leu
        595                 600                 605

Leu Ser Lys Ser His Asn Ala His Val Arg Cys Gly Thr Ala Phe Ala
    610                 615                 620

Leu Gly Ile Ala Cys Ala Gly Lys Gly Leu Gln Ser Ala Ile Asp Val
625                 630                 635                 640

Leu Asp Pro Leu Thr Lys Asp Pro Val Asp Phe Val Arg Gln Ala Ala
                645                 650                 655

Met Ile Ala Leu Ser Met Ile Leu Ile Gln Gln Thr Glu Lys Leu Asn
            660                 665                 670

Pro Gln Val Ala Asp Ile Asn Lys Asn Phe Leu Ser Val Ile Thr Asn
        675                 680                 685

Lys His Gln Glu Gly Leu Ala Lys Phe Gly Ala Cys Val Ala Gln Gly
    690                 695                 700

Ile Met Asn Ala Gly Gly Arg Asn Val Thr Ile Gln Leu Glu Asn Ala
705                 710                 715                 720

Asp Thr Gly Thr Leu Asp Thr Lys Ser Val Val Gly Leu Val Met Phe
                725                 730                 735

Ser Gln Phe Trp Tyr Trp Phe Pro Leu Ala His Phe Leu Ser Leu Ser
```

```
                740                 745                 750

Phe Thr Pro Thr Thr Val Ile Gly Ile Arg Gly Ser Asp Gln Ala Ile
        755                 760                 765

Pro Lys Phe Gln Met Asn Cys Tyr Ala Lys Glu Asp Ala Phe Ser Tyr
    770                 775                 780

Pro Arg Met Tyr Glu Glu Ala Ser Gly Lys Glu Val Glu Lys Val Ala
785                 790                 795                 800

Thr Ala Val Leu Ser Thr Thr Ala Arg Ala Lys Ala Arg Ala Lys Lys
                805                 810                 815

Thr Lys Lys Glu Lys Gly Pro Asn Glu Glu Glu Lys Lys Lys Glu His
            820                 825                 830

Glu Glu Lys Glu Lys Glu Arg Glu Thr Asn Lys Lys Gly Ile Lys Glu
        835                 840                 845

Thr Lys Glu Asn Asp Glu Glu Phe Tyr Lys Asn Lys Tyr Ser Ser Lys
    850                 855                 860

Pro Tyr Lys Val Asp Asn Met Thr Arg Ile Leu Pro Gln Gln Ser Arg
865                 870                 875                 880

Tyr Ile Ser Phe Ile Lys Asp Asp Arg Phe Val Pro Val Arg Lys Phe
                885                 890                 895

Lys Gly Asn Asn Gly Val Val Val Leu Arg Asp Arg Glu Pro Lys Glu
            900                 905                 910

Pro Val Ala Leu Ile Glu Thr Val Arg Gln Met Lys Asp Val Asn Ala
        915                 920                 925

Pro Leu Pro Thr Pro Phe Lys Val Asp Asp Asn Val Asp Phe Pro Ser
    930                 935                 940

Ala
945
```

(2) 信息 SEQ ID NO: 17:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 142 AA

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子 类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 17:

```
Trp Xaa Ile Arg Ser Asp Glu Arg Val Leu Gln Tyr Gly Glu Gln Asn
1               5                   10                  15

Ile Arg Arg Ala Val Pro Leu Ala Leu Gly Leu Leu Cys Ile Ser Asn
```

20 25 30

Pro Lys Val Thr Val Met Asp Thr Leu Ser Arg Leu Ser His Asp Arg
35 40 45

Phe Arg Ser Cys Asn Gly Ser Asn Tyr Leu Pro Trp Ile Asp Arg Arg
50 55 60

Trp Asn Gln Gln Cys Lys Asp Ser Trp His Ala Lys Ser Leu Gln Leu
65 70 75 80

Leu Leu Gln Gly Cys Pro Xaa Phe Phe Ser Val Cys Ala Ser Leu Lys
85 90 95

Gly Phe Xaa His Met Gly Lys Gly Leu Leu Thr Leu Asn Pro Phe His
100 105 110

Ser Glu Arg Ala Xaa Phe Leu Xaa Xaa Asn Pro Asp Phe Pro Trp Val
115 120 125

Gly Xaa Asn Phe Leu Gln Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Ile Glu Thr
130 135 140

2) 信息 SEQ ID NO: 18:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 97 AA
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子 类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 18:

Met Gln Pro Arg Met Leu Thr Thr Leu Val Glu Asp Glu Met Lys Pro
1 5 10 15

Gly Ser Leu Lys Gln Leu Asn Val Ser Val Arg Val Gly Gln Pro Val
20 25 30

Asp Val Val Ala Gln Ala Gly Lys Pro Lys Thr Ile Thr Gly Phe Gln
35 40 45

Thr His Thr Thr Pro Val Leu Leu Ala His Gly Glu Arg Ala Glu Leu
50 55 60

Ala Asn Asp Glu Tyr Leu Ser Val Thr Pro His Leu Glu Gly Leu Val
65 70 75 80

Ile Leu Lys Lys Asn Pro Asp Tyr Gln Pro Val Val Val Ser Thr Lys
85 90 95

Lys

(2) 信息 SEQ ID NO: 19:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 390 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子 类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 19:

ATCAGTGTCA CTACGGATAG TGATGACACT CACAGGAGGG CTGGGGGTAT CTGGAATGAT 60

GATTGGCTGA TGCTGGTCTT GGACAGGAAC TAGGGAATTA TAAGAAGATG TGGTACGAAG 120

AGGACTACTC CCANCCAGAG AATAAACTTG AGAAGGCAGG ACTTCCAGAG AGGATTTGGA 180

TGAAACTGGA GCAGACTGCT TATTCTACTT TGAAGGGAGG GAACTAGACT GTTGTTGTCT 240

GACAACATGG GCAACACCAA CATTCAGAGG CTGAGCAGTN GCCAAGGNCA CATGGTTGGT 300

CAGCAAAGAT GGCTGCTGCA TAATAGTGCT GTACTGGTCG NCATGAGAGT GGGCATTCCC 360

CAGTCAGCTA GCTGGTGGGC TGCTCCCCAT 390

(2) 信息 SEQ ID NO: 20:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 385 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子 类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 20:

CCTCTCAGTT ATCTCTGTTG GAGTAGTCCT CTTCGTACCA CATCTTCTTA TAATTCCCTA 60

GTTCCTGTCC AAGACCAGCA TCAGCCAATC ATCATTCCAG ATACCCCCAG CCCTCCTGTG 120

AGTGTCATCA CTATCCGTAG TGACACTGAT GAAGAAGAGG ACAACAAATA CAAGCCCAAT 180

AGCTCGAGCC TGAAGGCGAG GTCTAATGTC ATCAGTTATG TCACTGTCAA TGATTCTCCA 240

GACTCTGACT CCTCCCTGAG CAGCCCACAT TCCACAGCCA CTCTGAGTGC TCTGCGGGGC 300

AACAGTGGGA CCCTTCTGGA GGGACCTGGC AGACCTGCAG CAGATGGCAT TGGCACCCGT 360

ACTATCATTG TACCTGAGCG GCCGC 385

(2) 信息 SEQ ID NO: 21:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 444 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子 类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 21:

GGGAGCCTGT GCACCCCGAT GTCACCATGA AGCCACTGCC CTTCTATGAA GTCTATGGGG 60

AGCTCATCCG ACCCACCACC CTTGCGTCCA CCTCCAGCCA GAGGTTCGAG GAAGCCCACT 120

TCACCTTCGC GCTCACTCCC CAGCAGCTGC AGCAGATTCT CACGTCCAGG GAGGTTATGC 180

CAGGAGCCAA GTGTGATTAC ACCATACAAG TGCAGCTCAG ATTCTGTCTC TGTGAGACCA 240

GCTGCCCTCA GGAGGACTAT TTCCCCCCTA ACCTCTTTGT TAAGGTTAAT GGGAAACTCT 300

GCCCCCTGCC GGGTTACCTC CCTCCAACCC AAGAATGGAG CTGAGCCCAA GAGGCCCAGC 360

CGTCCGATCA ACATCACACC CTTGGCTCGA CTCTCAGCCA CTGTCCCCAA CACCATCGTA 420

GTTAATTGGG TCATCTTGAA GTTT 444

(2) 信息 SEQ ID NO: 22:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 888 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子 类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 22:

TCCAACACCA TCGTAGATAA ATTGGTCATC TGAGTTTGGA CCGGAATTAC TCCTTGTCCG 60

TGTACCCTGG TGAGGCAATT GACTGCAGGG ACCCTTCTAC ACAAACTCAG AGCCAAGGGG 120

ATCCGGAATC CAGACCATTC CCGGGCACTG ATCAAGGAGA AACTGACTGC TGACCCCGAC 180

AGTGAAGTGG CTACTACAAG TCTCCGGGTG TCACTCATGT GCCCGCTAGG GAAGATGCGC 240

CTGACTGTCC CGTGTCGTGC CCTCACCTGT GCCCATCTGC AGAGTTTCGA TGCTGCCCTT 300

TATCTACAGA TGAATGAGAA GAAGCCGACA TGGACGTGTC CTGTGCGTGA CAAGAAGGCT 360

CCCTATGAGT CGCTGATTAT TGATGGTTTA TTCATGGAAA TTCTTAATTC CTGTTCGGAT 420

TGTGATGAGA TCCAGTTCAT GGAAGATGGA TCCTGGTGTC CGATGAAACC CAAGAAGGAG 480

GCATCAGAGG TTTGCCCCCC GCCAGGGTAT GGGCTGGATG GTCTCCAGTA CAGCGCAGTC 540

CAGGAGGGAA TTCAGCCAGA GAGTAAGAAG AGGGTCGAAG TCATTGACTT GACCATCGAA 600

AGCTCATCAG ATGAGGAGGA TTTGCCCCCC ACCAAGAAGC ACTGCCCTGT CACCTCAGCG 660

GTCATTCCAG CCCTTCCTGG AAGCAAAGGA GCCCTGACCT CTGGTCACCA GCCATCCTCG 720

GTGCTGCGGA GCCCTGCAAT GGGCACACTG GGCAGTGACT TCCTGTCTAG TCTCCCGCTA 780

CATGAGTACC CACCTGCCTT CCCACTGGGG GTTGACATCC AAGGTTTAGA TTTTATTTTC 840

TTTTCTTCAG ACTGAGAGTC AGAATTACGG GCCTTCAGTT ATCATTCG 888

(2) 信息 SEQ ID NO: 23:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 392 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子 类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 23:

CCACTTCCTG GCCCACTGCC CCCAAACTGG GGACTCTCAC CGCAAGCTCC AACTCCAGCG 60

CCCCCTCCTG GTCGTGTCAG CAGCATTGTG GCTCCTGGGA GCTCCTTGAG GGAAGGGCAT 120

GGAGGACCCC TGCCTTCAGG TCCCTCTTTG ACTGGCTGTC GGTCAGACGT CATTTCCTTG 180

GACTGAGCTT TTTGGATTAT GAAATCAATC TCCATTGGCC CCAGCACTGA GCAGATCACG 240

TTGTGGGTTC CGAACCCCTG GCTGCTCTGA TCCCTCAGGG GTCATTGGCC AAAGGCCAGG 300

CCAGAGCTTC ATGGATACCT GCTTTTGGCC TTATCGCTGC CTAACAGGCC AGTACTCACA 360

GGGTTAACAT TTAACCTTTT TATGGTGGCC CG 392

(2) 信息 SEQ ID NO: 24:

(i) 序列特征:
(A) 长度: 425 bp
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子 类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 24:

AATTCGGCAC GAGGTTGTGC TGTGGGGAAG GGAGAAGGAT TTGTAAACCC CGGAGCGAGG 60

TTCTGCTTAC CCGAGGCCGC TGCTGTGCGG AGACCCCCGG GTGAAGCCAC CGTCATCATG 120

TCTGACCAGG AGGCAAAACC TTCCAACTGA GGACTTGGGG GATAAGAAGG AAGGTGAATA 180

TATTAAACTC AAAGTCATTG GACAGGATAG CAGTGAGATT CACTTCAAAG TGAAAATGAC 240

AACACATCTC AAGAAACTCA AAGAATCATA CTGTCAAAGA CAGGGTGTTC CAATGAATTC 300

ACTCAGGTTT CTCTTTGAGG GTCAGAGAAT TGCTGATAAT CATACTCCAA AAGAACTGGG 360

AATGGAGAAG AAAGATTGTG ATTTGAAGTT TTATCAGGAA CAAACGGGGG GTCATTCAAC 420

AGCTT 425

(2) 信息 SEQ ID NO: 25:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 455 AA

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学 线性

(ii) 分子 类型: 多肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 25:

mglstvpdll lplvllellv giypsgvigl vphlgdrekr dsvcpqgkyi hpqnnsicct 60

kchkgtylyn dcpgpgqdtd crecesgsft asenhlrhcl scskcrkemg qveissctvd 120

rdtvcgcrkn qyrhywsenl fqcfncslcl ngtvhlscqe kqntvctcha gfflrenecv 180

scsnckksle ctklclpqie nvkgtedsgt tvllplviff glcllsllfi glmyryqrwk 240

sklysivcgk stpekegele gtttkplapn psfsptpgft ptlgfspvps stftssstyt 300

pgdcpnfaap rrevappyqg adpilatala sdpipnplqk wedsahkpqs ldtddpatly 360

avvenvpplr wkefvrrlgl sdheidrlel qngrclreaq ysmlatwrrr tprreatlel 420

lgrvlrdmdl lgcledieea lcgpaalppa psllr 455

(2) 信息 SEQ ID NO: 26:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 454 AA

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学 线性

(ii) 分子 类型: 多肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 26:

mglptvpgll lslvllallm gihpsgvtgl vpslgdrekr dslcpqgkyv hsknnsicct 60

kchkgtylvs dcpspgrdtv crecekgtft asqnylrqcl scktcrkems qveispcqad 120

kdtvcgcken qfqrylseth fqcvdcspcf ngtvtipcke tqntvcncha gfflresecv 180

pcshckknee cmklclpppl anvtnpqdsg tavllplvil lglcllsfif islmcryprw 240

rpevysiicr dpvpvkeeka gkpltpapsp afsptsgfnp tlgfstpgfs spvsstpisp 300

ifgpsnwhfm ppvsevvptq gadpllyesl csvpaptsvq kwedsahpqr pdnadlaily 360

avvdgvppar wkefmrfmgl seheierlem qngrclreaq ysmleawrrr tprhedtlev 420

vglvlskmnl agclenilea lrnpapsstt rlpr 454

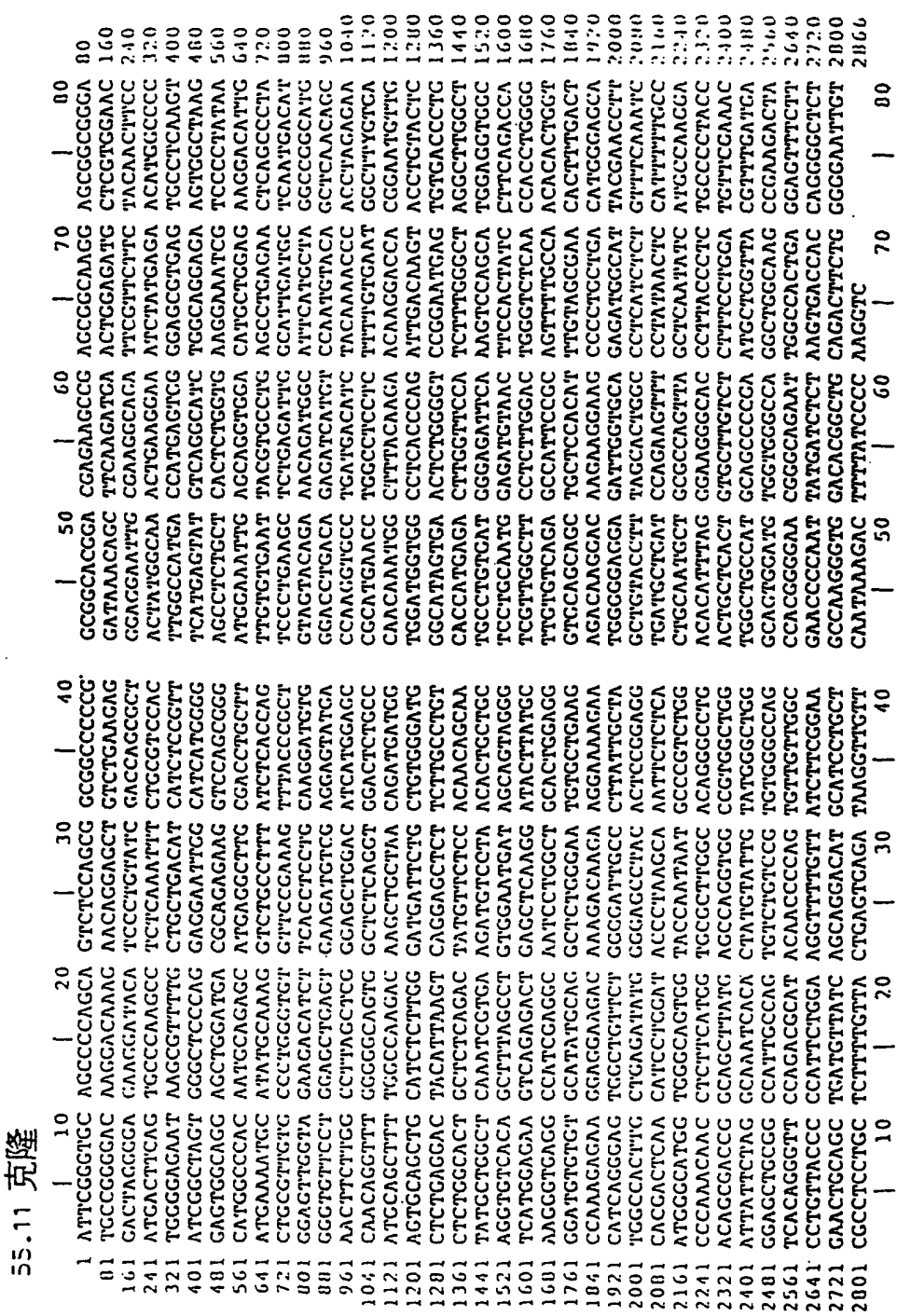


图 1a

(b) 75.3

5'GAATTCGGCACGAGCGGCACGAGGACAGAGTGAGACTCTGTCTCTTAAAATAATAATA
AAAATAAAAATAAAATGTGGGGCCGGGCAAGGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACCTT
GGGAGGCTGAGGCAGGAGGATTGCCTAAGCCCAGGAGTTTGACATCAGCCTGGGCAACAT
GGTGAAACCCCATCTCTACAAAAAATGCAAAAATTAGCCAGGTGTGGTGGGTGTGCTCCT
ATAGTCTCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGTAGAGGGGATCACCTGAGCCCAGGAAGTTTGG
AGGCTATAGTGAGCTGAAGACCCGCACCATTGCACGCCAGCCTGGAGCAAGAGACNCTGT
CTCCACATAAATAAATAAATAAATAAAAGTGGGGAACTTCTGTGTTAAGTCAGAAGGCAC
CACACAATTTGNATAGCCANCAACCATATTCAATACCCAATCTCTTTATTGCAATATAAG
TATTTGTAAACCCCTACACAAATATTCCCAAGAATAAGTTGGAATATAAATTACTATATC
AATCANCCAATAAAAATAAACACATACAGTATTTATTTCCTGTTGCTCCATATAAAGCTT
TGCTATTTCAATATAAAGCTTACCTAGTATGGTCATTTGAGCCTGAGCAGAGAATATGCC
CAAGCTCGTGCCGAATTC....GGCGNTCTGACTCTCTACTGAACCAAGACTGAATCAGA
GAGACTCGAGTGCNCTTATTTGATTAANCCCAAATTATTGAAACCTNTGATTTTTTCTGG
AGGNGGATGATAAAGATGTGAAAGTGTGATGAACAGTGTGTATCCCTACTCTTGATCCTG
GAACCAGACAAGCAAGAAGCTTTGATTGAAAGCCTATGTGAAAAGCTGGTCAAATTTCGC
GAAGGTGAACGCCCGTCTCTGAGACTGCAGTTGTTAAGCAACCTTTTCCACGGGATGGAT
AAGAATACTCCTGTAAGATACACAGTGTATTGCAGCCTTATTAAAGTGGCAGCATCTTGT
GGGGCCATCCAGTACATCCCAACTGAGCTGGATCAAGTTAGAAAATGGATTTCTGACTGG
AATCTCACCACTGAAAAAAAGCACACCCTTTTAAGACTACTTTATGAGGCACTTGTGGAT
TGTAAGAAGAGTGATGCTGCTTCAAAAGTCATGGTGGAATTGCTCGGAAGTTACACAGAG
GACAATGCTTCCCAGGCTCGAGTTGATGCCCACAGGTGTATTGTACGAGCATTGAAAGAT
CCAAATGCATTTCTTTGTGACCACCTTCTTACTTTAAAACCAGTCAAGTTTGTGGAAGGC
GAGCTTATTCATGATCTTTTAACCATTTGTGTGAGTGCTAAATTGGCATCATATGTCAAG
TTTTATCAGAATAATAAAGACTTCATTGATTCACTTGGCCTGTTACATGAACAGAATATG
GCAAAAATGAGACTACTTACTTTTATGGGAATGGCAGTAGAAAATAAGGAAATTTCTTTT
GACACAATGCAGCAAGAACTTCAGATTGGAGCTGATGATGTTGAAGCATTTGTTATTGAC
GCCGTAAGAACTAAAATGGTCTACTGCAAAATTGATCAGACCCAGAGAAAAGTAGTTGTC
AGTCATAGCACACATCGGACATTTGGAAAACAGCAGTGGCAACAACTGTATGACACACTT
AATGCCTGGAAACAAAATCTGAACAAAGTGAAAAACAGCCTTTTGAGTCTTTCTGATACC
TGAGTTTTTATGCTTATAATTTTTGTTCTTTGAAAAAAAAGCCCTAAATCATAGTAAAAC
ATTATAAACTAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAG 3'

图 1b

(c) 75.16

5'GTCCGGTTTACTTTAACTTAGTTTTGCATAGTTCTAGTGCACGTGAAATTGAAAAGTTA
TTTCCCTTTAGCTGTGTTATTATAGAGCAGAAATTCTGTTTTTAAAAATTAGCCTAAGATA
TACTTGTTTTTGTAAAGAAAAATATTTAATGCTTGAACAAAATAAATTGGAGTTGGAGTAG
AATGTAGTTTGAGGAAATTTGCAGCTTCCAATGCCTCTG.....CAGAGGCATTGGAAGCT
GCAAATTTCCTCAAACTACATTCTACTCCAACTCCAATTTATTTTGTTCAAGCATTAAATA
TTTTTCTTTACAAAAACAAGTATATCTTAGGCTAATTTTTAAAAACAGAATTTCTGCTCTA
TAATAACACAGCTAAAGGGAAATAACTTTTCAATTTCACGTGCACTAGAACTATGCAAAAC
TAAGTTAAAGTAAACCGGAC 3'

图 1c

55.11pep 长度：900 March 10, 1995 19:08 类型 P 检验：9498 .

```
   1  RVQPQQSPAA APGGTDEKPS GKERRDAGDK DKEQELSEED KQLQDELEML
  51  VERLGEKDTS LYRPALEELR RQIRSSTTSM TSVPKPLKFL RPHYGKLKEI
 101  YENMAPGENK RFAADIISVL AMTMSGEREC LKYRLVGSQE ELASWGHEYV
 151  RHLAGEVAKE WQELDDAEKV QREPLLTLVK EIVPYNMAHN AEHEACDLLM
 201  EIEQVDMLEK DIDENAYAKV CLYLTSCVNY VPEPENSALL RCALGVFRKF
 251  TRFPEALRLA LMLNDMELVE DIFTSCKDVV VQKQMAFMLG RHGVFLELSE
 301  DVEEYEDL*TE IMSNVQLNSN FLALARELDI MEPKVPDDIY KTHLENNRFG
 351  GSGSQVDSAR MNLASSFVNG FVNAAFGQDK LLTDDGNKWL YKNKDHGMLS
 401  AAASLGMILL WDVDGGLTQI DKYLYSSEDY IKSGALLACG IVNSGVRNEC
 451  DPALALLSDY VLHNSNTMRL GSIFGLGLAY AGSNREDVLT LLLPVMGDSK
 501  SSMEVAGVTA LACGMIAVGS CNGDVTSTIL QTIMEKSETE LKDTYARWLP
 551  LGLGLNHLGK GEAIEAILAA LEVVSEPFRS FANTLVDVCA YAGSGNVLKV
 601  QQLLHICSEH FDSKEKEEDK DKKEKKDKDK KEAPADMGAH QGVAVLGIAL
 651  IAMGEEIGAE MALRTFGHLL RYGEPTLRRA VPLALALISV SNPRLNILDT
 701  LSKFSHDADP EVSYNSIFAM GMVGSGTNNA RLAAMLRQLA QYHAKDPNNL
 751  FMVRLAQGLT HLGKGTLTLC PYHSDRQLMS QVAVAGLLTV LVSFLDVRNI
 801  ILGKSHYVLY GLVAAMQPRM LVTFDEELRP LPVSVRVGQA VDVVGQAGKP
 851  KTITGFQTHT TPVLLAHGER AELATEEFLP VTPILEGFVI FGRTPIMISK
```

下面划线者：与 SEN3 具有同源性
黑粗线：下面双线，核定位信号
★头端

图 1d

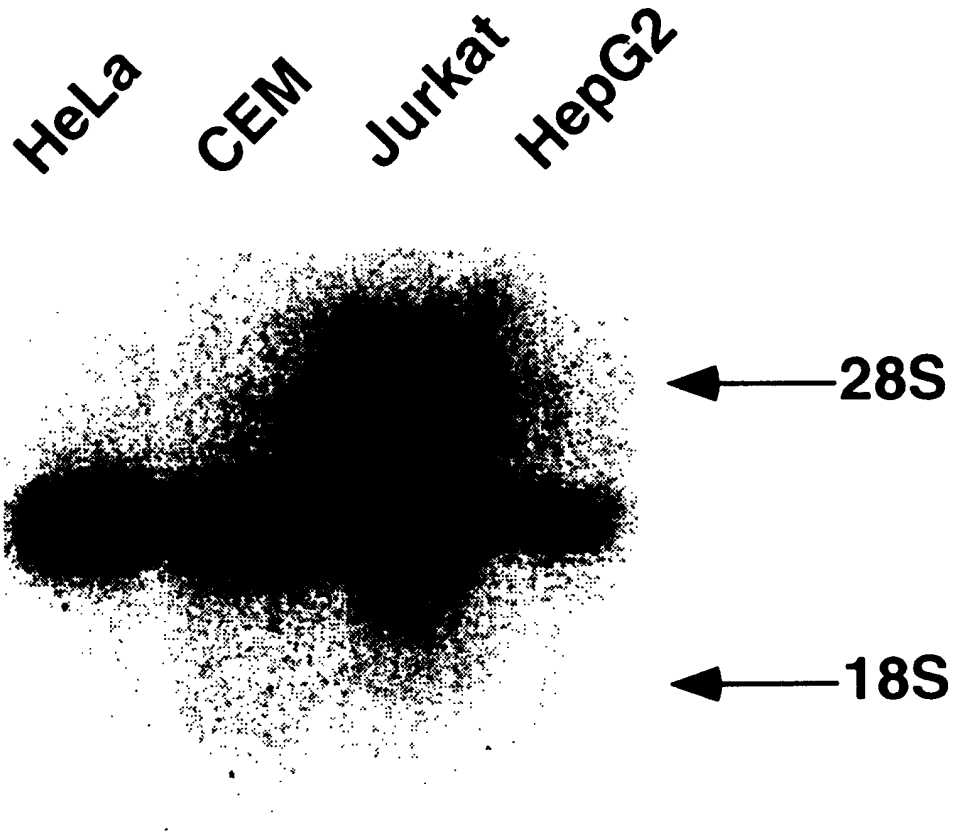


图 2

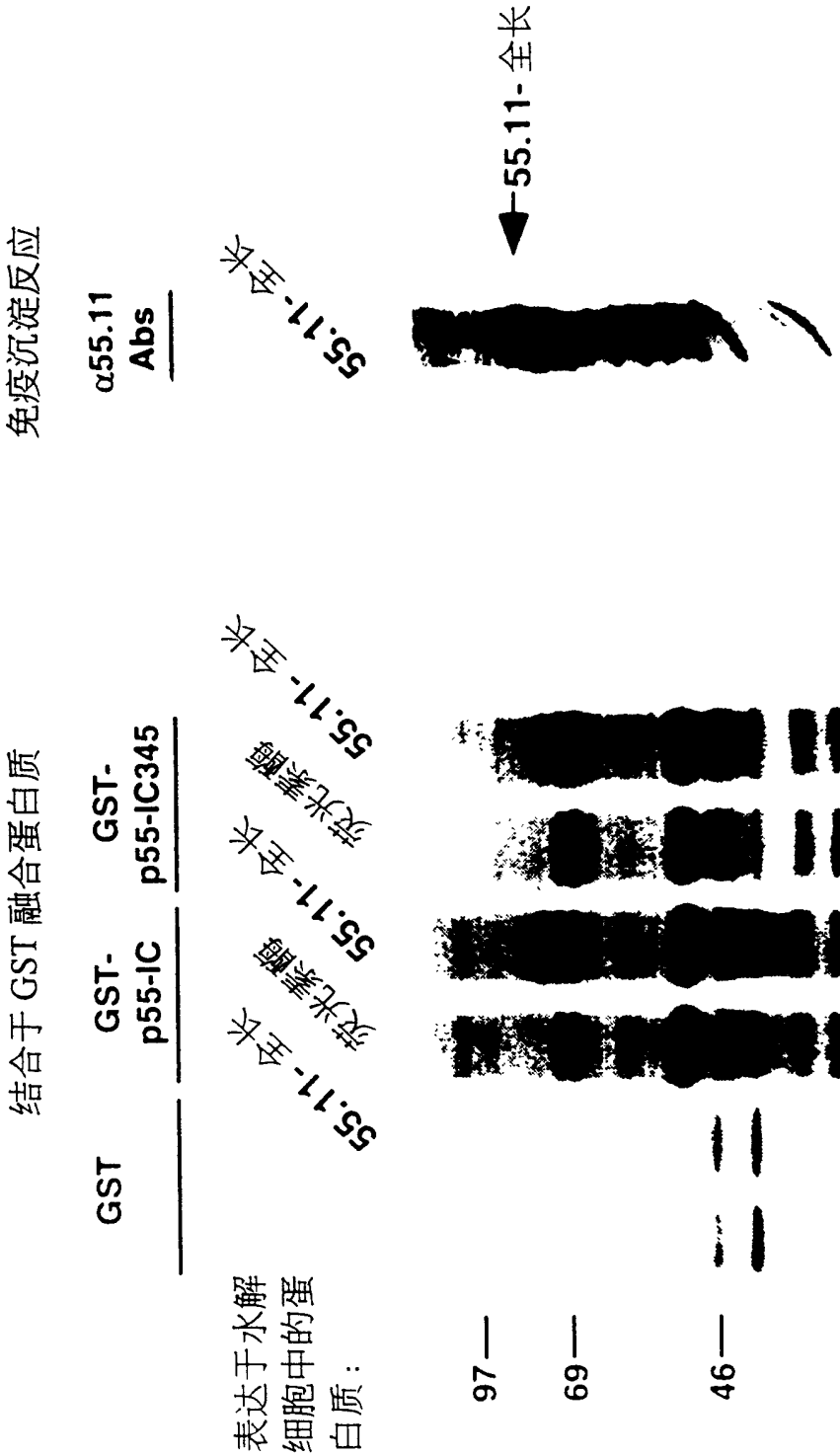

免疫沉淀反应
α55.11
Abs
55.11-全长
55.11-全长
结合于 GST 融合蛋白质
GST
GST-
p55-IC
GST-
p55-IC345
55.11-全长
荧光素酶
55.11-全长
荧光素酶
55.11-全长
表达于水解
细胞中的蛋
白质：
97
69
46

图 3a

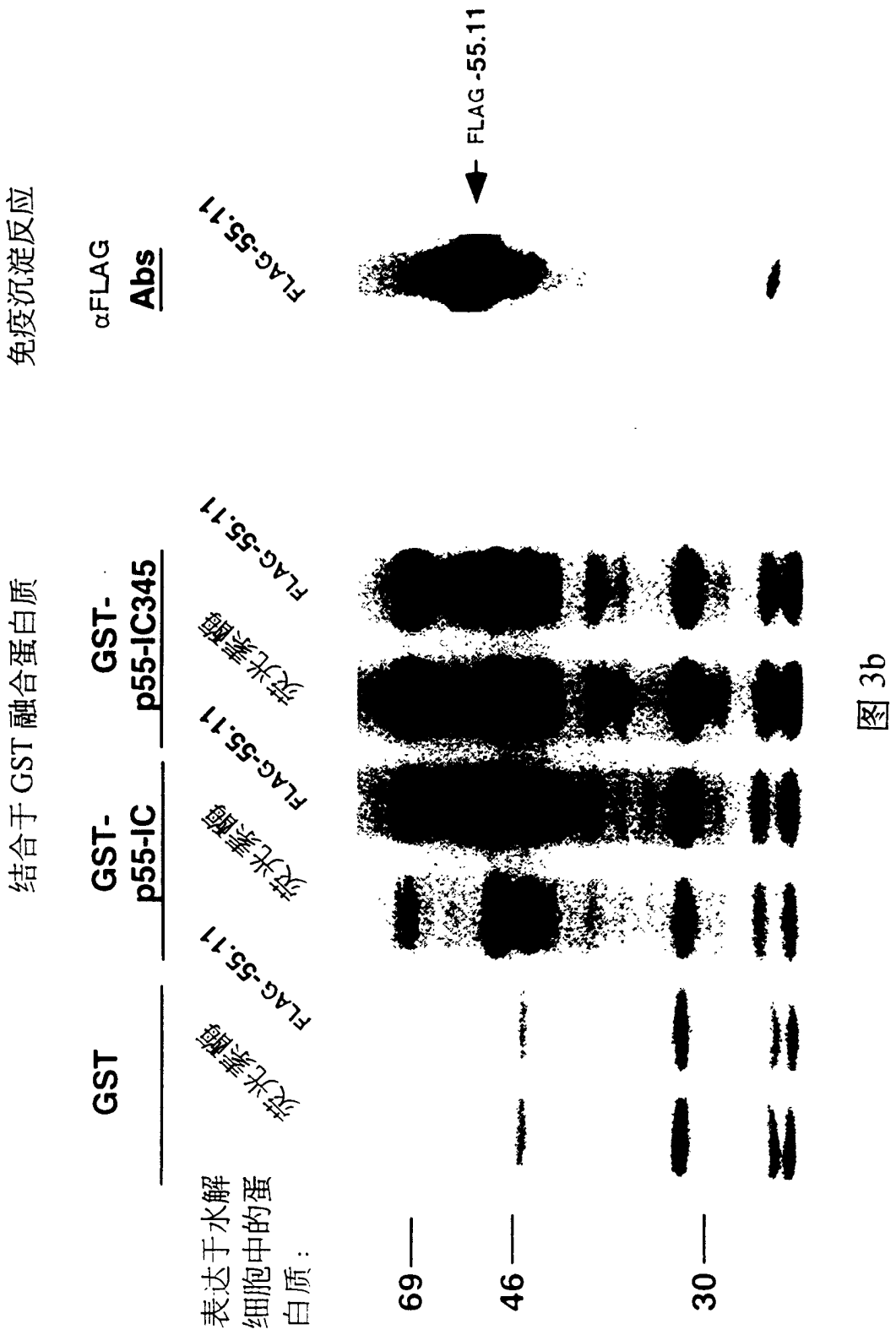

免疫沉淀反应
αFLAG
Abs
FLAG-55.11
FLAG -55.11
结合于 GST 融合蛋白质
GST
GST-
p55-IC
GST-
p55-IC345
FLAG-55.11
缺失突变体
FLAG-55.11
缺失突变体
FLAG-55.11
缺失突变体
表达于水解
细胞中的蛋
白质：
69
46
30

图 3b

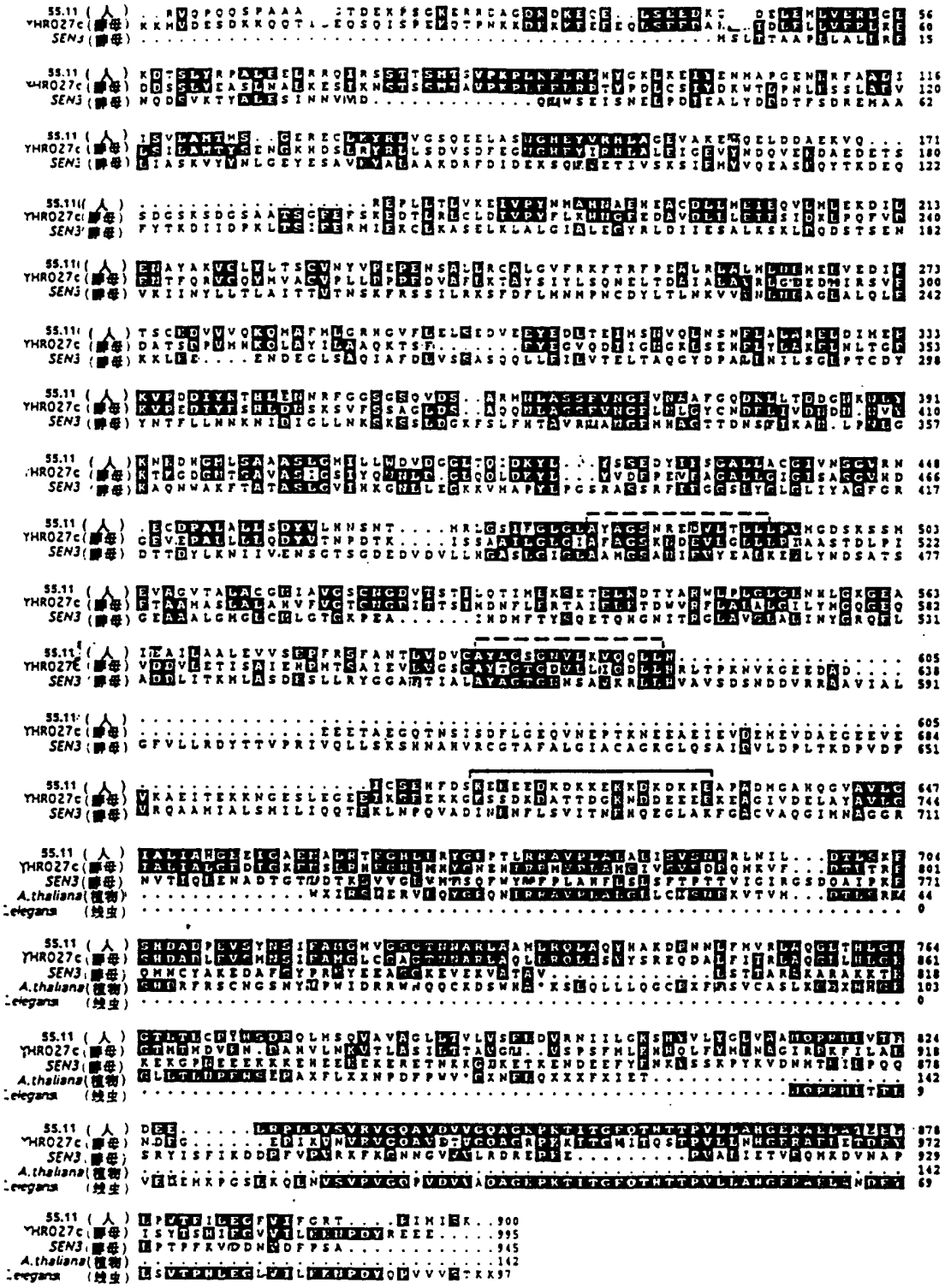


图 4

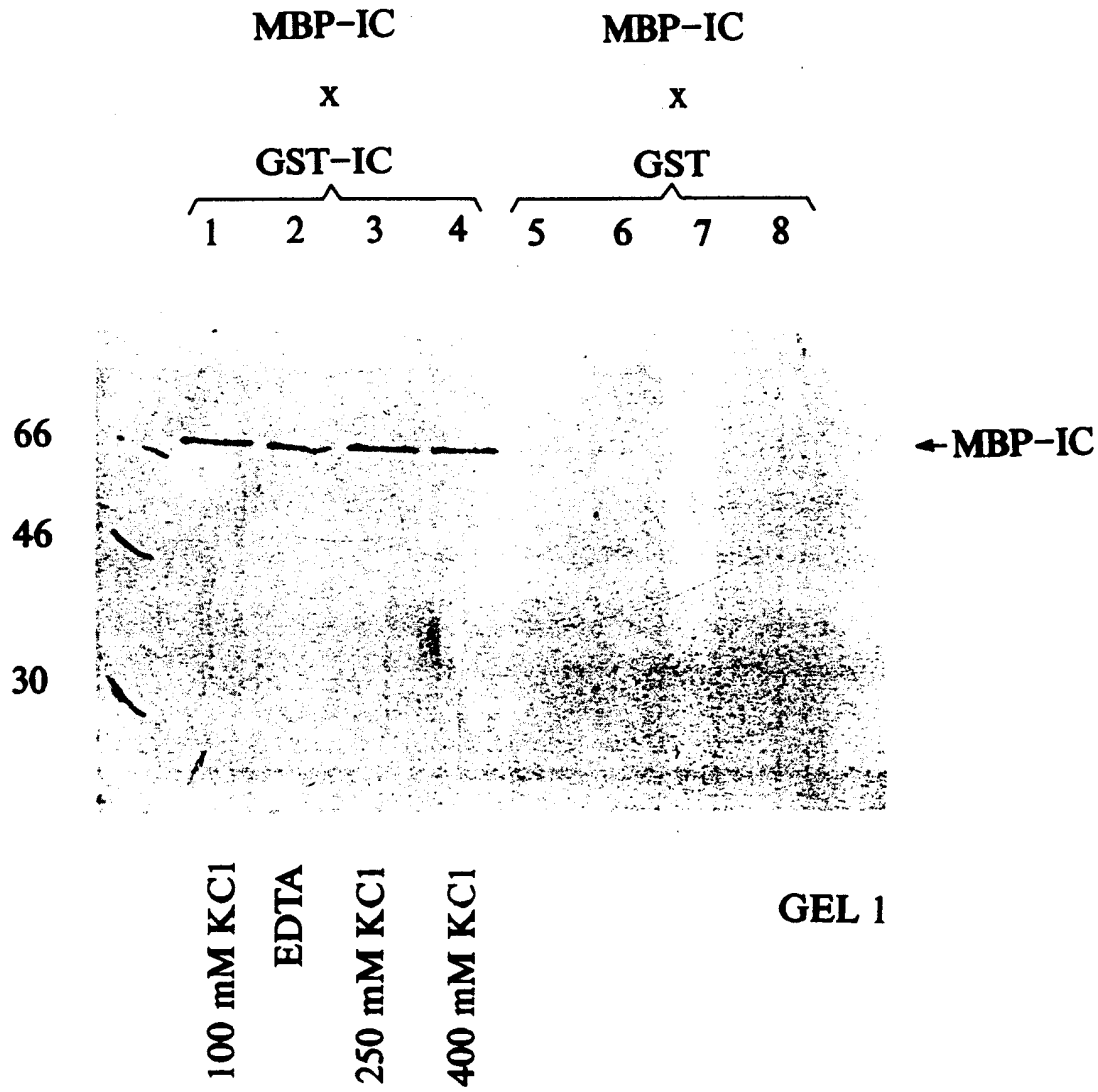

MBP-IC
x
GST-IC
MBP-IC
x
GST
1 2 3 4 5 6 7 8
66
46
30
MBP-IC
100 mM KCl
EDTA
250 mM KCl
400 mM KCl
GEL 1

图 5



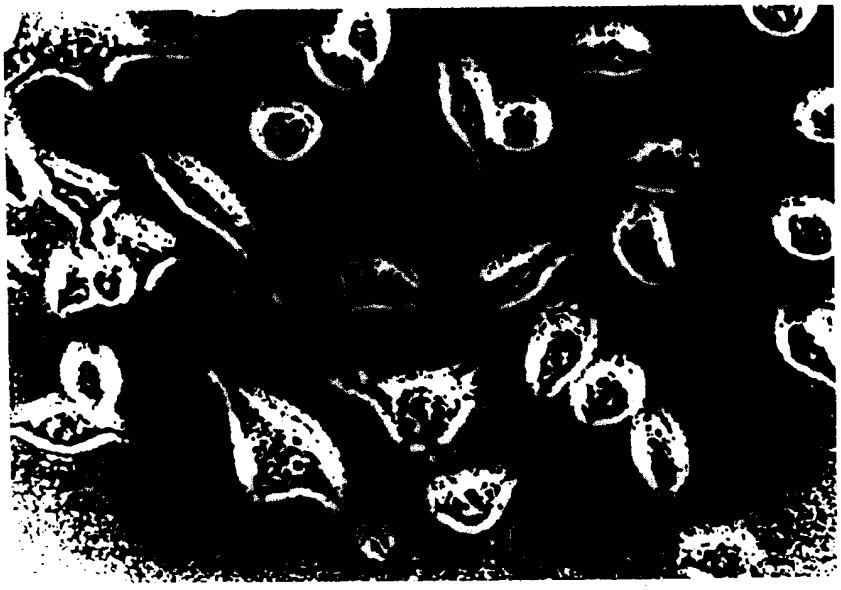


图 9

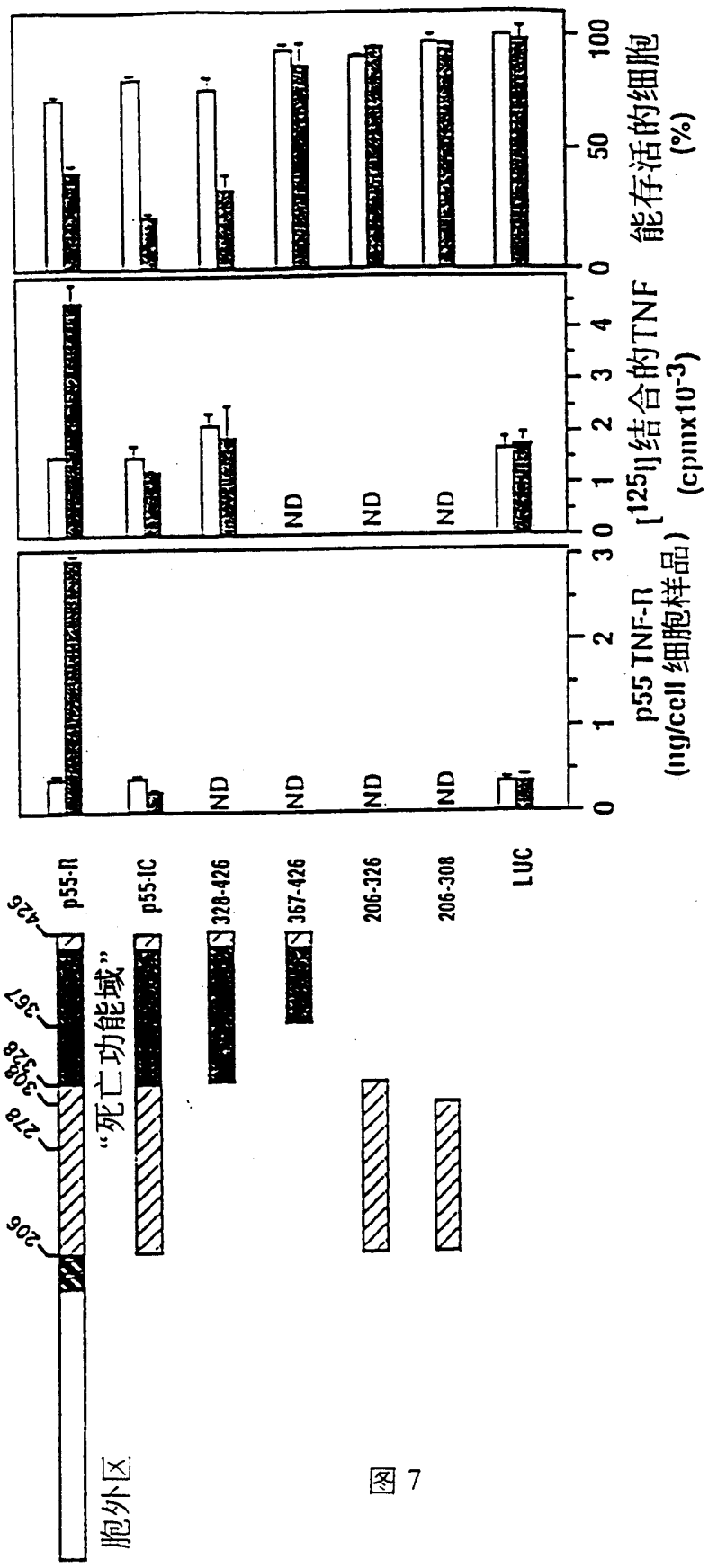

胞外区
206
278
328
367
426
"死亡功能域"
p55-R
p55-IC
328-426
367-426
206-326
206-308
LUC
ND
0 1 2 3
p55 TNF-R
(ng/cell 细胞样品)
0 1 2 3 4
[125I]结合的TNF
(cpmx10-3)
0 50 100
能存活的细胞
(%)

图 7

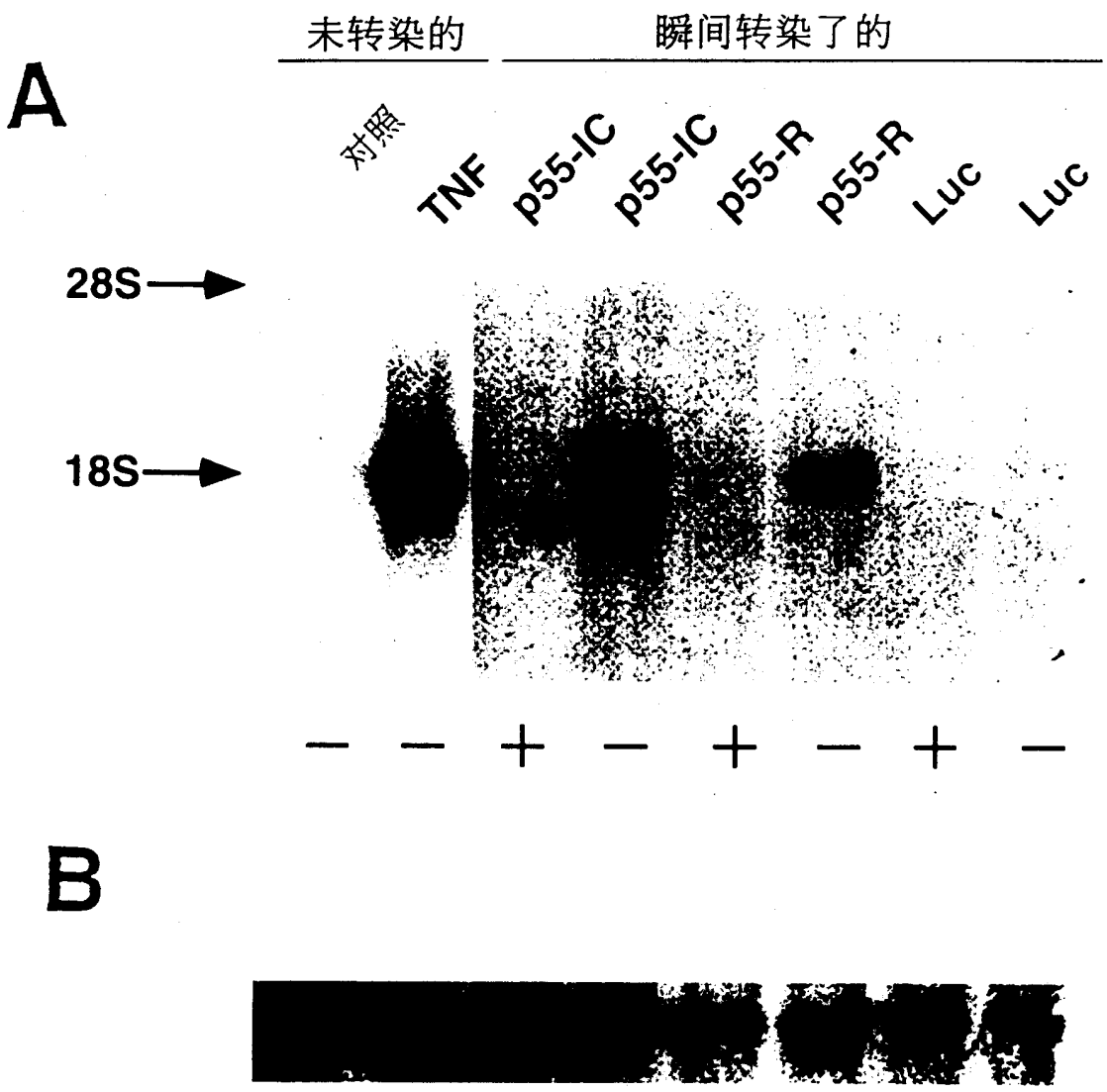


图 8

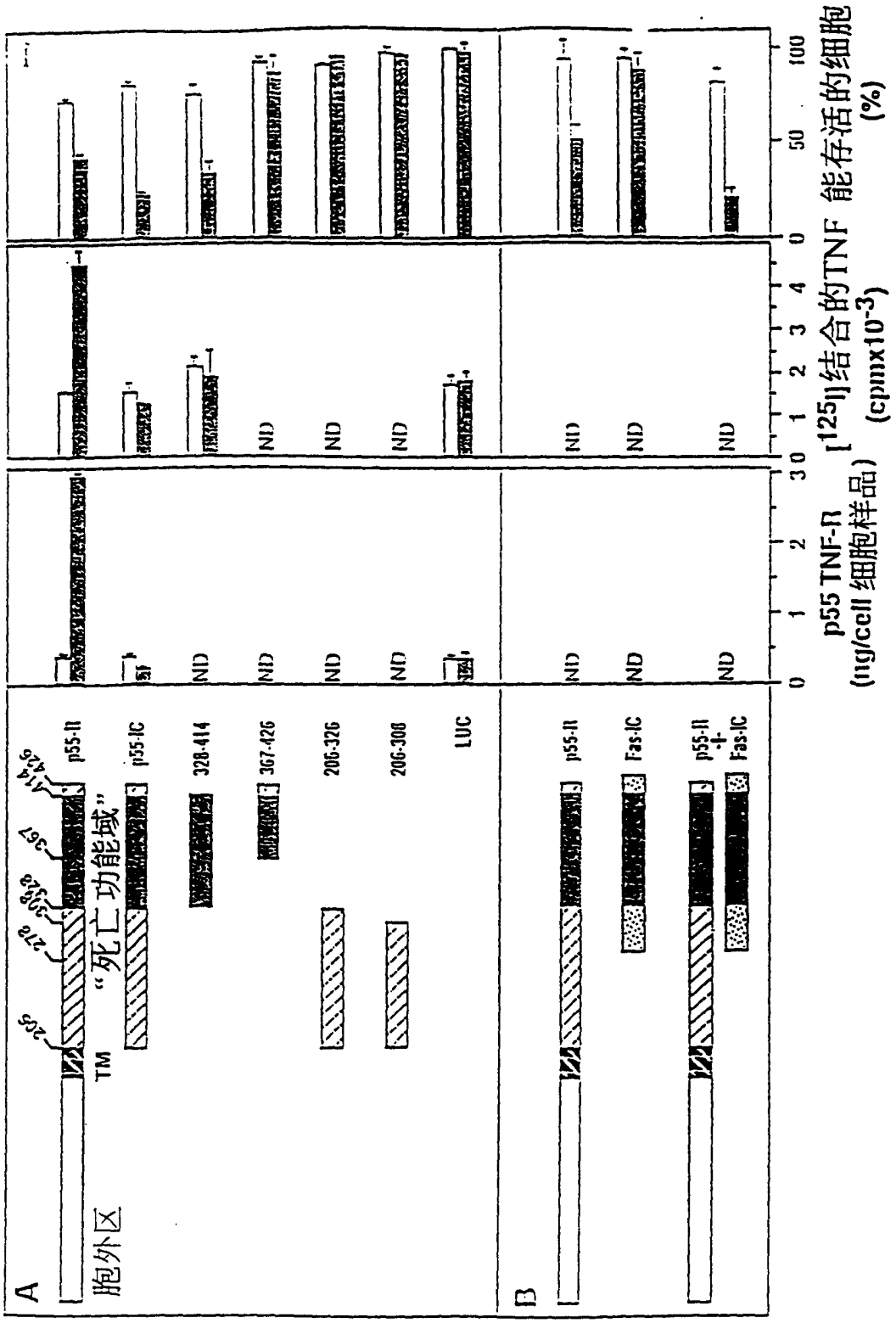

A
胞外区
TM
"死亡功能域"
p55-II
p55-IC
328-414
367-426
206-326
206-308
LUC
ND
B
p55-II
Fas-IC
p55-II + Fas-IC
p55 TNF-R (ng/cell 细胞样品)
[125I]结合的TNF (cpmx10-3)
能存活的细胞 (%)
0 1 2 3 0 50 100

图 9

F2 克隆

ATCAGTGTCACTACGGA TAGTGATGACACTC ACAGGAGGGCTGGGGGTATCTgGAATGATGATT
GGCTGATGCTGGTCTTGGACAGGAACTAGGGAA TTATAAGAAGATGTGGTACGAAGAGGACTAC
TCCCANCCAGAGAATAAACTTGAGAAGGCAGGACTTCCAGAGAGGATTTGGATGAAACTGGAGC
AGACTGC TTAT TCTACTT TGAAGGGAGGGAACTAGACTGTTGTTGTCTGACAACATGGGCAACA
CCAACATTCAGAGGCTGAGCAGTNGcCAAGGNCACATGGTTGGTCAGCAAAGATGGCTGCTGCA
TAATAGTGCTGTACTGGTcGNCATGAGAGTGGGCATTCCCCAGTCAGCTAGCTGGTGGGCTGCT
CCCCAT . . . . . .

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN . . . . . .

cctctcagtt atctctgttggagtagtcctcttcg taccacatcttcttataattccctagttcc tgtccaagaccagcatcagcCAA
TCATCAT TCCAGATACCCCCAGCCCTCCTGTGAGTGTCATCACT ATcCG TAGTGACACTGAT
GAaGAaGAGGACAACAAATACAAGCCCAATAGCTCGAGCCTGAAGGcGAGGTCT AATGTCAT
CAGTTATG TCACTGTCAATGAT TCT CCAGACTCTGACTCCTCCCTGAGCAGCCCACATTCCA
CAGCCACTCTGAGTGCTCTGcGGGG cAACAGTGGGACCCTTCTGGAGGGACCTGGCAGACC
TGCAGCAGATGGcAT TGGCACCCGT ACTATCATTGTACCTGAGCGGCCGC . . . . . .
. . . . . .

图 10

F9克隆

GGGAGCCTGTGCACCCCGATGTCACCATGAAGCCACTGCCCT TCTAT GAAGTCTATGGGGAGCTCATCCGAC
CCACCACCCTTGCGTCCACCTCCAGCCAGAGGTTCGAGGAAGCCCAC TTCACCTTCGCGCTCACTCCCCAGC
AGCTGCAGCAGAT TCTCACGTCCAGGGAGGTTATGCCAGGAGCCAAG TGTGATTACACCATACAAGTGCAGC
TCAGA TTC TGTCTCTGTGAGACCAGCTGCCCTCAGGAGGACTATTTCCCCCCTAACCTCTT TGT TA AGGTTA
ATGGGAAACTCTGCCCCCTGCCGGGTTACCTCCCTCCAACCCAAGAATGGAGCTGAGCCCAAGAGGCCCAGC
CGTCCGATCAACATCAC ACCCTTGGCTCGACTCTCAGCCACTGTCCCCAACACCATCG TAGTT AAT TGGGTC
ATC TTGAAGTT T.....
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN.....
tCC AACACCATCGTAGA T AAATTGgTC ATCTGAGTT TGGaCCGGAATTACTCC tTGTC CGTGT ACCCTGGTG
AGGCAATTGACTGCAGGG ACCCTTCTACACAAACTCAGAGCCAAGGGGATCCGGAATCCAGACCATTCCCGG
GCACTGATCAAGGAGAA ACTGACTGCTGACCCCGACAGTGAAGTGGCTACTAC AAGTCTCCGGGTGTCACTC
ATGTGCCCGCTAGGGAAGATGCGCCTG ACTGTCCCGTGTCGTGCCCTCACCTGTGCCCAT CTGCAGAGTTTC
GATGCTG cCCTTT ATCT AcAGA Tg aaT GAGAAgAAGCCGACATGGACGTGTCCTGTGCGTGACAAGAAGGCT
CCCTATG AGTCGcTGAT TAT TGAT GGTTT AT TCATGGAAAT TCT TAATTCCT GTTCGGATTGTGATGAGATC
CAGTTCA TGGAAGATGGATCCTGG TGTCCGATGAAACCCAAGAAGGAGGcATCAGAGGTTTGCCCCCCGCCA
GGGTATGGGCTGGaTGGTCTCCA GTACAGCGCAGtCCAGGAGGGAATTCAGCCAGAGAGTAAGAAGAGGGTC
GA aGTCAT TGACTTGACCATCGA AAGCTCATCAGATGAGGag gAT TTGcCCCCCACCAAGAAGcACTGCCCT
GT CACCTCAGCGGtCAT TCCAGCCCT TCCTGGAAGCAAAGGAGCCCTGAcCTCTGGTCACCAGcCATCCTCG
GT GCTGCGGAGCCCTG CAATGGGCACACTGGGcAGTGACTTCCTGTCTAGTCTCCCGCTACATGAGTACCCA
CC TGCCT TCCCACTGGGGG tT GACATCCAAGGTT TAGATTT TATTT TCTTT TCTTCAGACTGAGAGTCAGAA
T TACGGGC CTTCAGT T ATCAT TCG.....
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN.....
CCACT TCC TGGCCCAC TGCCCCCAAACTGGGGACTCTCACCGcAAGCTCcAACTCCAGCgCCCCCTCCTGGT
CGTGTC AGCAGC ATTG TGGCTCCTGGGAGC TCCTTGAGGGAAGGGCATGGAGGACC CCTGCCTTCAGGTC
CCTCT T TGACTGG CTG TCGGTCAGACGTCA T TTCCTTGGACT GAGCTT TTT GGATT ATGAAATCAATCTCC
A TTGGCCCCAGCA CTG AGCAGATCACGTTG T GGGTTCCGAACCCCTGGCTGCTCTG ATCCCTCAGGGGTC
A TTGGCCAAAGGC CAG GCCAGAGCTTCATGG A TACCTGCTT TTGGCCT TATCGCTGCCTAACAGGCCAGT
AC TCACAGGGTTA AC A TT TAAC CTTTTTATGGTGGCCCG

图 11

DD11 克隆

```
. . . . . .
AATTCGGCACGAGGTTG TGCTGTGGGGAAGGGAGAAGGATTTGTAAACCCCGGAGCGAGGTTCTGCTTACCC
GAGGCCGCTGCTGTGCGGAGACCCCCGGGTGAAGCCACCGTCATCATGTCTGACCAGGAGGCAAAACCTTCc
AAC TGAGGACTTGGGGGGAT AAGAAGGAAGGGTGAA TATA TTAAACTCAAAGTCATTGGACAGGATAGCAGTGA
GA TTCAC TTCAAAG TGAAA ATGACAACACA TCTC AAGAAACTCAAAGAATCATACTGTCAAAGACAGGGTGT
TCC AATG AATTCAC TCAGG TT TCTCT TTGAGGGTC AGAGAATTGCTGATAATCATACTCCAAAAGAACTGGG
AAT GGAGAAGAAAGA TTGT GA TT tGA aGTTT TATCAGGAACAAACGGGGGGGTCATTCAACAGcTT. . . . . .
. . . . . .
. . . . . .
```

图 12